

Medizinische Fakultät der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Immunologie

**Charakterisierung von Antikörpern in Säure-Eluaten aus
irreversibel abgestoßenen Nierentransplantaten**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Ioana Miruna Roth, geb. Heretiu
aus Arad/Rumänien

2008

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. O. Witzke

Tag der mündlichen Prüfung: 27 November 2008

Teile der im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Heinemann FM, Roth I, Rebmann V, Arnold ML, Witzke O, Wilde B, Spriewald BM, Grosse-Wilde H. Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. Hum Immunol. 2007 Jun;68(6):500-6. Epub 2007 Mar 21

Ein Sonderdruck der Publikation befindet sich im Anhang.

Inhaltverzeichnis	Seite
1. Einleitung	6
1.1 Das HLA-System	6
1.1.1 Organisation des HLA-Systems	7
1.1.2. Polymorphismus und Nomenklatur des HLA Systems	7
1.1.3. Expression von HLA-Merkmalen in verschiedenen Geweben	8
1.1.4. Struktur der HLA-Moleküle	9
1.1.5 Physiologische Bedeutung der HLA-Merkmale	10
1.2 HLA-Merkmale und Organtransplantation	12
1.2.1 Immunologie der Abstoßungsreaktion	13
1.2.2 Antikörperstatus vor und nach einer Nierentransplantation	14
1.2.3 Non HLA-Antikörper	16
1.3 Ausgangslage und Zielsetzung	17
 2. Material und Methoden	 18
2.1 Patientendaten und Nierenorgane	18
2.2 Material und Reagenzien	19
2.1.1 Lymphozytotoxizitätstest (LCT)	19
2.2.2 Lamda Antigen Tray (LAT™, One Lambda Inc.)	19
2.2.3 B-Screen™ Enzymimmunoassay (Genetic Testing Institute)	20
2.3 Methoden	20
2.3.1 Elution der Antikörper aus den Nierenorganen	20
2.3.2 Antikörpernachweis im Lymphozytotoxizitätstest	21
2.3.3 Antikörpernachweis im ELISA	24
2.3.4 Messung der IgG-, IgA- und IgM- Konzentrationen	26
2.3.5 Messung der Proteinkonzentrationen	26
2.3.6 Testung von 4 Eluaten auf Leukozyten- und Thrombozytenantikörper	27
2.3.6.Statistik	27
 3. Ergebnisse	 28
3.1 Antikörpernachweis im Lymphozytotoxizitätstest (LCT)	28
3.2 HLA-Klasse I Antikörpernachweis im ELISA (LAT™, One Lambda)	30
3.3 HLA-Klasse I Antikörper: Vergleich zwischen LCT und ELISA	31
3.3.1 HLA-Klasse I Spezifizierung im LCT und im ELISA	31

3.3.2 Panelreaktivität der HLA-Klasse I Antikörper im LCT und im ELISA	32
3.3.3 LCT positive / ELISA negative Eluate	32
3.3.4 LCT negative / ELISA positive Eluate	33
3.4 HLA Klasse II-Antikörpernachweis im ELISA (LAT™ und B-Screen™ (Enzymimmunoassay)	33
3.5 Eluate mit LCT und ELISA negativem Antikörperstatus	35
3.6 Antikörperstatus im Serum vor und nach Nierentransplantation	35
3.7 Transplantatüberleben und HLA-Antikörper-Status der Eluate	36
3.8 HLA-Mismatch-Rate und HLA-Antikörper-Status der Niereneluate	37
3.9 IgG, IgA und IgM-Konzentration und Proteinkonzentration in den Niereneluaten	38
4. Diskussion	39
4.1 Vergleich der Methoden: Lymphozytotoxizitätstest (LCT) und ELISA	39
4.2 HLA-Klasse I und II Antikörper in den Niereneluaten	41
4.3 Donorspezifische Antikörper in den Niereneluaten	42
4.4 Nicht donorspezifische Antikörper in den Niereneluaten	43
4.5 Nicht zytotoxische HLA-Antikörper in den Niereneluaten	45
4.6 Zytotoxische non HLA-Antikörper in den Niereneluaten	47
4.7 Eluate mit negativem Antikörperstatus im LCT und ELISA	49
4.8 Fazit	50
5. Zusammenfassung	52
6. Literaturverzeichnis	53
Anhang	
Tabellen und Abbildungen	60
Verzeichnis der Abkürzungen	82
Danksagung	83
Lebenslauf	84
Publikation	85

1. Einleitung

Die Aufgaben des menschlichen Immunsystems bestehen im Schutz und Erhalt der Integrität des Organismus durch Abwehr körperfremder sowie pathogener körpereigener Einflüsse. Voraussetzung dafür ist einerseits die Erkennung und Unterscheidung von „Körpereigenem“ und „Körperfremdem“, sowie das Vorhandensein effektiver Abwehrmechanismen, die humorale und zelluläre Komponenten aufweisen. Während die antigenspezifische, humorale Immunantwort durch Antikörper vermittelt wird, stehen bei der adaptiven, zellulären Immunabwehr T-Lymphozyten mit entsprechenden antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren im Vordergrund.

Zentrale Elemente der Immunabwehr sind die humanen Leukozytenantigene (engl. Human Leukocyte Antigens, HLA), die durch ihre Funktion der Antigenpräsentation eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung spezifischer Abwehrmechanismen einnehmen.

1.1. Das HLA-System

Die Beschreibung der ersten menschlichen Leukozytenantigene erfolgte erstmalig in den 50-er und 60-er Jahren (Dausset, 1954; Van Rood, 1962; und Payne, 1964). In der Folgezeit wurde eine Vielzahl von HLA-Merkmalen entdeckt.

Die HLA-Merkmale werden von einem Gen-Komplex kodiert, der wegen der Bedeutung für die Gewebeverträglichkeit als menschlicher Haupthistokompatibilitäts-Komplex oder im Englischen Major Histocompatibility Complex (MHC) bezeichnet wird. Der HLA-Gen-Komplex ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6p21 lokalisiert. Ihrer Funktion und Struktur entsprechend werden HLA-Klasse I, -II, und -III Gene unterschieden.

1.1.1. Organisation des HLA-Systems

Die HLA-Klasse I Region umfasst Gene, die für sog. „klassische“, HLA-Klasse Ia Antigene (HLA-A, -B, -C) und für sog. „nicht-klassische“ HLA-Klasse Ib Antigene, (HLA-E, -F, -G) kodieren. Die transplantationsrelevanten HLA-A, -B und -C Genorte kodieren für die α -Kette der HLA-Klasse Ia Moleküle. Im Gegensatz dazu sind die nicht-klassischen Antigene geringfügig polymorph, werden nicht ubiquitär exprimiert und haben nach derzeitigen Literaturangaben keinen Bezug zur Transplantation.

Innerhalb der HLA-Klasse II Region finden sich drei wichtige Abschnitte: HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP, die für die α - und β -Ketten der HLA Klasse II Moleküle kodieren. Im Zusammenhang mit der Transplantation kommen in der HLA Klasse II Region den Genorten HLA-DRB1 und -DQB1 die größte Bedeutung zu. Darüber hinaus gibt es in dieser Region weitere Genorte für TAP1/2, LMP2/7, die für die HLA-Klasse II assoziierte Antigenprozessierung Bedeutung besitzen.

Zwischen der HLA-Klasse I und HLA-Klasse II Region befindet sich die Genorte der HLA-Klasse III Antigene, die keine Bedeutung für die Induktion einer zellulären Immunantwort haben und sich in den strukturellen Eigenschaften von den HLA-Molekülen unterscheiden (nach Janeway, 2002; Klein, 2000).

Die wichtigsten transplantationsrelevanten Antigene sind die HLA-A, HLA-B und HLA-DR-Antigene, was in dem extremen Polymorphismus dieser Merkmale begründet ist.

1.1.2. Polymorphismus und Nomenklatur des HLA Systems

Aus der Notwendigkeit einer systematischen Erfassung der extrem polymorphen HLA-Gene entwickelte sich im Verlauf der Zeit eine international gültige Nomenklatur des HLA-Systems.

Ursprünglich war es nur möglich, die HLA-Antigene als Zelloberflächenantigene von vitalen Zellen durch serologische Techniken zu erfassen. Die serologisch definierten Merkmale unterscheiden 28 HLA-A-, 61 HLA-B-, 10 HLA-Cw-, 21 HLA-DR-, 9 HLA-DQ- und 6 HLA-DP- Spezifitäten.

Die Nomenklatur der serologisch definierten HLA-Merkmale sieht vor: Name des Genortes (HLA-A,-B,-Bw,-Cw,-DR,-DQ,-DP) und nachgestellt die Nummer des Merkmals (z.B. HLA-A9). Die Angabe der Nummer eines Feinmerkmals (engl. „split“) erfolgt vor dem in Klammern angegebenen Hauptmerkmal (engl. „broad“) wie z.B: HLA-A25(10), oder ohne Angabe des Hauptmerkmals (z.B: HLA-A25).

Molekulargenetisch durch Sequenzierung erhöhte sich die Anzahl der nachgewiesenen Allele um ein Vielfaches. Bis heute wurden 489 HLA-A, 830 HLA-B, 266 HLA-C, 3 HLA-DRA, 545 HLA-DRB, 34 DQA1, 78 HLA-DQB1, 23 HLA-DPA1 und 125 HLA-DPB1 Allele definiert (Stand Dezember 2006, The International Immunogenetics / HLA Sequence Database). Diese Daten sind in der Abb. 1.1 zusammengefasst.

Informationen über Aminosäuresequenzen der HLA-Moleküle führten zur Identifikation von multiplen polymorphen Determinanten oder Epitopen der HLA-Antigene. Epitope, die für ein bestimmtes HLA-Molekül spezifisch sind, werden eigene (engl. „private“) Determinanten genannt. Andere Epitope, die auf verschiedenen HLA-Molekülen vorkommen, werden als gemeinsame (engl. „public“) Epitope bezeichnet.

1.1.3. Expression von HLA-Merkmalen in verschiedenen Geweben

HLA-Klasse I Merkmale sind auf allen kernhaltigen Zellen in mehr oder weniger starkem Ausmaß exprimiert. Die Zellen des Immunsystems tragen viele HLA-Klasse I Merkmale an ihrer Oberfläche, während andere Zellpopulationen wie z.B. Nierenzellen verhältnismäßig geringere Mengen exprimieren. HLA-Klasse I Merkmale fehlen auf Trophoblasten der Plazenta, auf Spermien und auf neuronalen Zellen (Daar, 1984a; Janeway, 2002).

HLA-Klasse II Merkmale kommen nur auf wenigen Immunzellarten vor, wie Antigen präsentierenden Zellen, Zellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und Epithelialzellen. Nach Aktivierung können auch T-Lymphozyten HLA-Klasse II Antigene exprimieren (Daar, 1984b). Ferner sind sie auf hämatopoietischen Vorläuferzellen nachzuweisen. Interferone, die im Verlauf der Immunantwort freigesetzt werden, können die Expression von HLA-Klasse II Antigenen auf Fibroblasten, spezifischen Epithelien und Endothelien induzieren (Cresswel et al., 1987).

1.1.4. Struktur der HLA-Moleküle

HLA-Klasse I Moleküle sind auf der Zelloberfläche exprimierte Heterodimere, die aus zwei Polypeptidketten bestehen: einer „schweren“ α -Peptidkette mit einem Molekulargewicht von 44 kD, und einer „leichten“ β 2-Mikroglobulin-Kette von 11,5 kD Gewicht, welche zur Stabilisierung der HLA-Klasse I Moleküle dient. Die β -Kette ist außerhalb des HLA-Genkomplexes auf Chromosom 15 codiert.

Die α -Peptidkette besteht aus einem extrazellulären Teil mit drei globulären Domänen (α 1, α 2 und α 3), aus einer transmembranalen Region und einer kurzen zytoplasmatischen Region. Die α 1 und α 2 Domänen bilden eine Peptidbindungsgrube, in die Peptide mit einer Länge von 9 bis 10 Aminosäuren binden können. Die α 3-Domäne und das β 2-Mikroglobulin unterstützen diese konformere Struktur. Während die Aminosäuresequenz der α 3-Domäne sich relativ konstant darstellt, weisen die α 1 und α 2 Domänen hypervariable Regionen auf, die für den Polymorphismus der HLA Klasse-I Antigene verantwortlich sind (nach Janeway, 2002; Klein, 2000).

Die HLA-Klasse II Moleküle sind ebenfalls Heterodimere, bestehend aus einer α -Kette von 33 kDa Gewicht und einer β -Polypeptidkette von 28 kDa, die beide membranal verankert sind. Jede der α - und β -Ketten hat eine Peptid-bindende Domäne, die hypervariable Abschnitte aufweist (α 1, β 1), eine Immunglobulin ähnliche Domäne mit einer geringen Variabilität (α 2, β 2), eine transmembranale Region und eine kurze zytoplasmatische Region. Der wesentliche Unterschied zu HLA-Klasse I Molekülen besteht darin, dass die beiden Spalt bildenden α 1- und β 1-Domänen an beide Seiten offen sind, wodurch die Bindung von Peptiden von 16 bis 20 Aminosäuren möglich wird (nach Janeway, 2002; Klein, 2000).

Die Abbildung 1.2 bietet ein Überblick über die Struktur und Funktion der HLA Klasse I und II Moleküle.

1.1.5 Physiologische Bedeutung der HLA-Merkmale

Die zentrale Aufgabe der HLA-Merkmale besteht in der Präsentation von Antigenfragmenten an der Zelloberfläche, wodurch T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor fremde Antigene erkennen können. Die Tatsache, dass T-Zellen ein Fremdantigen nur in Verbindung mit einem autologen HLA-Merkmal erkennen, wird als HLA-Restriktion bezeichnet.

HLA-Klasse I Merkmale präsentieren den CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen endogene Antigenpeptide, die aus dem intrazellulären Abbau von Proteinen im Zytoplasma entstehen (z.B. aus viralen oder onkogenen Produkten). Nach der Proteolyse der Antigene im Proteasom werden die Peptide mit Hilfe von Transportermolekülen (TAP-1 und TAP-2) in das endoplasmatische Retikulum transportiert und in die Bindungstasche der neu synthetisierten HLA-Klasse I Moleküle eingeschleust.

HLA-Klasse II Merkmale präsentieren den CD4-positiven T-Helferzellen exogene Peptide, die aus dem extrazellulären Kompartiment stammen (z.B. lösliche Antigene). Die Peptide sind durch den Abbau von Proteinen in Phagolysosomen entstanden und werden nach der Fusion mit Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums an die HLA-Klasse II Merkmale gebunden. Die Peptid beladenen HLA-Antigene erscheinen an der Zellmembran der Antigen präsentierenden Zelle (APZ).

Eine Peptid präsentierende Zelle muss eine T-Zelle finden, die den entsprechenden spezifischen T-Zell-Rezeptor besitzt. Der T-Zell-Rezeptor ist ein Immunglobulin ähnliches Heterodimer, bestehend aus zwei Polypeptidketten, jede mit variabler Region für die spezifische Bindung an dem Peptid-HLA-Komplex (CDR1, CDR2 und CDR3) und konstanter Region für die Verankerung in der T-Zellmembran und weiteren Signalübertragung in den Zellkern. T-Zell-Rezeptoren sind mit einer Gruppe von Oberflächenrezeptoren assoziiert, dem CD3-Komplex, die maßgeblich an der Transduktion des Aktivierungssignals vom T-Zell-Rezeptor zum Zellinneren der T-Zelle verantwortlich sind.

Ein stabiler Kontakt zwischen der Antigen präsentierenden Zelle und der T-Zelle setzt die Beteiligung so genannter Auxilliärproteine voraus. Zu diesen gehören CD4 für die

Interaktionen mit der β 2-Domäne der HLA-Klasse II Merkmale, und CD8 für die Bindung an die α 3-Domäne der HLA-Klasse I Merkmale.

Die Aktivierung von naiven T-Zellen erfordert neben der Bindung von dem T-Zell-Rezeptor an den Peptid-HLA-Komplex ein zweites, kostimulatorisches Signal von derselben Antigen präsentierenden Zelle (APZ). Auf professionellen APZ werden als kostimulatorische Signale B7-Moleküle exprimiert, die an das T-Zell Protein CD28 binden. Weitere Rezeptor-Ligand Paare sind CD40 mit dem CD40 Ligand CD 154 oder CD2 und sein Ligand CD58.

Die Aktivierung naiver T-Zellen durch die Erkennung eines Peptid-HLA-Komplexes bei gleichzeitiger Kostimulation induziert die Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) und die Expression hochaffiner IL-2 Rezeptoren. IL-2 führt zur klonalen Proliferation der naiven T-Zelle und zur Differenzierung der aktiven Effektorzelle.

Die Effektorzellen der zellvermittelten Immunantwort sind zytotoxische CD8 positive-T Zellen, die von HLA-Klasse I Antigenen präsentierte endogene Peptide erkennen. Zytotoxische T-Zellen können Zielzellen durch die Freisetzung von Zytotoxinen abtöten. Eine weitere Klasse von T-Effektorzellen sind die CD4-positiven T-Helferzellen (T_{h1} - und T_{h2} -Zellen), die an HLA-Klasse II Moleküle gebundene exogene Peptide erkennen.

T_{h1} -Zellen beteiligen sich durch die Aktivierung von Makrophagen bei der zellvermittelten Immunität; darüber hinaus sind T_{h1} -Zellen auch in die humorale Immunität involviert, indem die B-Zelle zur Bildung von opsonisierenden Antikörper vom IgG1 und IgG3 Subtyp anregen.

Die Interaktion zwischen einer T_{h2} -Zelle und einer Antigen präsentierenden B-Zelle führt zur Expression von B-Zell-stimulierenden Effektormolekülen wie CD40-Ligand und Zytokinen, welche eine klonale Proliferation und Differenzierung der B-Zelle zur einer Antikörper sezernierenden Plasmazelle induzieren. T_{h2} -Zellen steuern auch den Immunglobulin-Klassenwechsel, der zur Produktion verschiedener Isotypen von Antikörpern führt. In der frühen Phase der Immunantwort werden Komplement aktivierende IgM-Antikörper gebildet. Im späteren Verlauf werden IgG-Antikörper mit höherer Affinität gegen das Antigen produziert und auch Antikörper der IgA-Klasse (in der Lamina propria), sowie in kleinen Mengen auch der IgE-Klasse (an der Oberfläche der

Mastzellen). Die Antikörper können durch Neutralisierung (IgG, IgA, weniger IgM), Opsonisierung (IgG1, IgG3, weniger IgA) oder Komplementaktivierung (IgM, IgG1, IgG3, partiell IgG2 und IgA) ein Antigen eliminieren. Die verschiedenen Arten von Immunglobulinen bilden zusammen die Effektmoleküle der humoralen Immunantwort (nach Janeway, 2002; Klein, 2000; Roitt, 2000).

1.2 HLA-Merkmale und Organtransplantation

Bei einer Organtransplantation zwischen genetisch differentem Spender und einem Empfänger gleicher Spezies (allogene Transplantation) werden HLA-Merkmale des Spenders übertragen, die im Empfänger humorale und zelluläre Abwehrreaktionen (sog. Host-versus-Graft Reaktionen) auslösen können. Die Grundlage einer erfolgreichen Transplantation ist eine möglichst hohe Übereinstimmung der HLA-Merkmale von Spender und Empfänger.

Mit zunehmender Anzahl von Fehlpaarungen (engl. „Mismatches“) der HLA-A, HLA-B und HLA-DR Merkmale zwischen Spender und Empfänger wird nach erfolgter Nierentransplantation eine Verkürzung des Transplantatüberlebens beobachtet (Opelz et al. 1994, 1999, 2000). Die HLA-Kompatibilität am HLA-DR Locus hat dabei den stärksten Einfluss auf das Transplantatüberleben, gefolgt vom HLA-B Genort. Obwohl sich HLA-A Merkmale bezüglich der Antigenexpression von HLA-B Merkmalen nicht wesentlich unterscheiden, hat die HLA-A Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger den geringsten Effekt auf den Transplantationsverlauf (Gilks, 1987; Thorogood, 1990; Zhou, 1993; Feucht, 1996). Eine mögliche Erklärung wäre eine gegenüber HLA-B und DR schwache Immunogenität der HLA-A Merkmale. Die Immunogenität der HLA-Merkmale wird durch die Expressionsdichte der HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche beeinflusst. Diese ist für HLA-C Moleküle relativ gering. Deshalb wird HLA-C gegenwärtig für den Transplantationsverlauf für irrelevant gehalten. Daten über den Einfluss von HLA-DP und HLA-DQ Mismatches auf das Transplantatüberleben stehen zurzeit noch nicht ausreichend zu Verfügung.

1.2.1 Immunologie der Abstoßungsreaktion

Eine Abstoßungsreaktion beinhaltet dieselben Elemente, die bei den immunologischen Prozessen im Rahmen der Infektabwehr beobachtet werden. Die Erkennung der fremden HLA-Klasse II Antigene durch CD4 positive T-Helfer Zellen des Spenders stellt den Beginn einer zellulären Abstoßung dar. Die Alloantigenerkennung erfolgt direkt, d.h. durch Kontakt der fremden HLA-Antigene, die an der Oberfläche der Transplantatzelle exprimiert werden, mit den T-Zellen des Empfängers, oder indirekt über die Aufnahme löslicher spenderspezifischer Antigene durch Antigen präsentierende Zellen des Empfängers und anschließender Präsentation an CD4 positiven T-Helfer Zellen. Die Alloantigenerkennung führt, wie im Abschnitt 1.1.5 beschrieben, durch Aktivierung der T-Zellen und Sekretion von Zytokinen zur Produktion von Alloantikörpern, die durch Komplementaktivierung oder durch antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität die Lyse von Transplantatzellen induzieren (humorale Abstoßungsreaktion). Die Zytokine helfen auch den zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen, die Zytotoxizität gegen das Transplantat zu entwickeln (zelluläre Abstoßungsreaktion), oder induzieren eine gesteigerte Expression der HLA-Klasse II Merkmale an den Gefäßendothelien.

Nach dem histopathologischen Bild und dem zeitlichen Ablauf unterscheidet man die hyperakute, die akute und die chronische Abstoßung, wobei das Ergebnis der histologischen Untersuchung bestimmend ist.

Bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion handelt es sich um eine humoral ausgelöste Organzerstörung durch präformierte zytotoxische Antikörper, die spezifisch an die Endothelzellen des Transplantats binden und diese nach Aktivierung des Komplementsystems lysieren. Die hyperakute Abstoßung führt zu einem sofortigen, irreversiblen Transplantatverlust. Histologisch stehen Endothelläsionen im Vordergrund, welche die intravasale Gerinnung fördern und einen raschen thrombotischen Verschluss der Blutgefäße mit ischämischen Nekrosen des Transplantats zur Folge haben.

Die akute Abstoßung, welche einen Zeitrahmen von Tagen bis Wochen nach Transplantation aufweist, ist in der Regel auf zellulären Mechanismen zurückzuführen. Hierbei induzieren zytotoxische T-Lymphozyten, aktivierte Makrophagen oder natürliche Killerzellen eine Zellyse des Transplantats. Die akute vaskuläre Abstoßung wird durch

gegen Endothelantigene gerichtete IgG-Antikörper vermittelt, die eine Gefäßschädigung hervorrufen. Die C4d-Ablagerung in den Transplantatkapillaren als Zeichen einer Aktivierung der antikörpervermittelten Komplementkaskade sind ein hilfreicher Marker bei der Differenzierung zwischen einer humoralen und einer zellulären Abstoßung (Feucht, 2003; Crespo, 2003; Mauiyedi, 2002). Auch komplementunabhängige Antikörper können zu einer akuten vaskulären Abstoßung führen (Karuppan, 1992; Nanni-Costa, 1996; Luchiani, 2000). Die akute Abstoßung stellt einen entscheidenden Prädiktor für eine chronische Abstoßung dar.

Die chronische Organabstoßung ist durch eine langsame Gewebeerstörung innerhalb von Monaten bis Jahren gekennzeichnet. Dieser Prozess weist sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten auf. Die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und die Bildung chemotaktischer Faktoren führt zu einer zunehmenden monozytären und lymphozytären Infiltration. Die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren hat einen mitogenen Einfluss auf Zellen der glatten Muskulatur und Fibroblasten, was eine zunehmende interstitielle Fibrose und eine Sklerosierung des Gewebes zur Folge hat (Ronald, 1997). Die chronische Abstoßung ist häufig therapieresistent und führt zum irreversiblen Verlust des Transplantats.

In der Entwicklung einer Transplantatabstoßung spielen zusätzlich zu den immunologischen Parametern auch Alloantigenunabhängige Faktoren wie Ischemiezeiten, Grunderkrankung und Vorerkrankungen, Alter des Spenders/Empfängers, Perfusions- und Reperfusionsschäden, virale Infektionen, vaskuläre und urologische Komplikationen am Transplantat oder Cyclosporin-A/Tacrolimus Nephrotoxizität eine Rolle.

1.2.2 Antikörperstatus vor und nach einer Nierentransplantation

Vor einer Nierentransplantation müssen präformierte, spenderspezifische Antikörper beim Organempfänger ausgeschlossen werden, was durch die Durchführung einer sog. Kreuzprobe (Cross-Match) zwischen Serum des Empfängers und Lymphozyten des Organspenders gewährleistet wird (Terasaki, 1964; Kissmayer-Nielsen, 1969). Eine positive lymphozytäre Kreuzprobe ist ein sicherer Prädiktor für eine sog. hyperakute Abstoßung und stellt eine Kontraindikation für die Transplantation dar.

Die Bildung von HLA-spezifischen Antikörpern, d.h. die sog. Sensibilisierung des Organempfängers gegen HLA-Antigene, kann durch Transplantationen, HLA-inkompatible Bluttransfusionen oder Schwangerschaften erfolgen. Deswegen werden Serumproben von Patienten, die auf eine Organtransplantation warten, regelmäßig auf HLA-spezifische Antikörper geprüft (sog. Antikörper-Screening). Trägt ein angebotenes Organ ein oder mehrere HLA-Antigene, gegen die der Patient bereits Antikörper gebildet hat, sollte das Organ diesem Patienten mit aktuell negativem Antikörperstatus nicht transplantiert werden, da das Immunsystem des Empfängers durch Aktivierung von Memory B-Lymphozyten zu Plasmazellen erneut Antikörper gegen diese HLA-Antigene nach der Transplantation bilden kann (sog. Booster-Effekt).

Autoantikörper der IgM-Klasse können eine positive Lymphozyten-Kreuzprobe hervorrufen, ohne dass sie eine Gefahr für das Transplantat darstellen. Es wurden jedoch bei Patienten mit IgM Autoantikörpern auch HLA spezifische Antikörper der IgM-Klasse detektiert (Khan, 2003). Solche HLA spezifische IgM-Antikörper sind für das Transplantatergebnis nur im Fall einer Retransplantation relevant (Taylor, 1989; Kermann, 1991; Ten Hoor, 1993; Zachary, 1995).

Von besonderem Interesse sind Antikörper der IgA-Klasse, falls sie als sog. anti-idiotypische Antikörper auftreten, denen eine „protektive“, immunmodulatorische Wirkung im Rahmen der Nierentransplantation zugeteilt wird. Es liegen Hinweise vor, dass solche Antikörper in Verbindung mit wiederholten Bluttransfusionen auftreten können (Süsal, 1995). Antikörper der IgA-Klasse können auch gegen HLA gerichtet sein. Patienten mit HLA-Antikörpern der IgA-Klasse zeigten ein besseres 1-Jahres-Transplantatüberleben als Patienten ohne präformierte IgA-Antikörper. (Koka, 1993; Kerman, 1996).

P.Terasaki konnte zeigen, dass nach einer Abstoßungsreaktion fast alle Patienten (96%) HLA-Antikörper aufweisen. Das Auftreten von HLA-Antikörpern im Serum nach Transplantation kann einer chronischen Abstoßungsreaktion Jahre vorausgehen und ist ein negativer Prediktor für das Transplantatüberleben (Terasaki, 2003).

Donorspezifische Antikörper treten mit einer Prävalenz von ca. 25% im Serum nach einer erfolgten Transplantation auf (McKenna, 2000) und haben einen negativen Einfluss auf das Transplantatüberleben. Der Anteil irreversibel geschädigter Organe 4-6 Wochen nach

Transplantation ist bei Patienten mit donorspezifischen Antikörpern doppelt so hoch wie bei solchen ohne donorspezifische Antikörper (Gorth, 2000).

1.2.3 Non HLA-Antikörper

Das Endothelial-Monozyten Alloantigensystem wurde zuerst vom Moraes und Stastny 1977 beschrieben, die Alloantiseren identifizierten, die mit Endothelialzellen, Monozyten und teilweise mit Keratinozyten, nicht aber mit T und/oder B Lymphozyten reagierten. Solche Antikörper können Abstoßungsreaktionen bei Patienten mit negativem Lymphozyten Cross-Match erklären. Die Präsenz von non HLA-Antikörpern bei HLA-identischen (Cerilli, 1983; 1985) als auch bei nicht-HLA-identischen (Baldwin, 1983; Kalil, 1989) Nierentransplantationen, war mit einem reduzierten Transplantatüberleben korreliert. Weitere Publikationen berichten über non-HLA-Antikörper der IgM Klasse, die gegen Endothelialzellen gerichtet sind, nicht mit Monozyten, Lymphozyten oder Keratinozyten reagieren und für wiederholte hyperakute Abstoßungen verantwortlich waren. Solche Antikörper konnten in Eluaten aus irreversibel abgestoßenen Nierenexplantaten identifizieren werden (Lucchiari, 2000). In einer großen Studie, in der Patienten und deren HLA-identische Geschwisterspender untersucht wurden, berichtet G. Opelz über den Einfluss von non HLA-Antikörpern auf die chronische Abstoßung von Nierentransplantaten (Opelz, 2005).

1.3 Ausgangslage und Zielsetzung

Es wird davon ausgegangen, dass die in einem irreversibel abgestoßenen Nierenorgan deponierten Antikörper mit der Abstoßung in einem ursächlichen Zusammenhang stehen. Eine Säure-Elution aus dem Explantat und eine HLA-Spezifizierung dieser Antikörper können präzise Informationen über die klinische Bedeutung dieser Antikörper geben.

Lerner und Mitarbeiter (1967) waren die ersten, die nach Säure-Elution Autoantikörper in irreversibel abgestoßenen Nierenorganen zeigen konnten. Inzwischen weisen verschiedene Veröffentlichungen auf Antikörper in Niereneluaten hin, die gegen T- und/oder B-Lymphozyten aber auch gegen Monozyten oder Endothelialzellen gerichtet sind (Lucas, 1970; Metzger, 1972; Jeannet, 1975; Tilney, 1979; Claas, 1980; Mohanakumar, 1979; 1980; 1981; Baldwin, 1981; Lee, 1981; Nunez, 1981; Vögeler, 1985; Joyce, 1988; 1989; Lucchiari, 2000; Martin, 2003; 2005).

Der Standardnachweis von HLA-spezifischen Alloantikörpern im Rahmen der Organtransplantation ist der komplementabhängige LCT, der Antikörper der nicht Komplement aktivierenden IgA und IgG2 bzw. IgG4-Klassen nicht detektieren kann. Mittlerweile sind ELISA-Formate für den Nachweis von HLA-Antikörpern etabliert worden, die auch HLA-Antikörper ohne Komplementaktivierung nachweisen können. In keiner der bisher veröffentlichten Studien wurden Niereneluat zusätzlich zum LCT auch mit einem ELISA-Verfahren untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, aus 103 explantierten Nierenorganen, Eluate durch Säure-Elution zu gewinnen und diese Eluate mittels LCT und ELISA auf die Präsenz von spezifischen HLA-Antikörpern zu untersuchen. Der HLA-Antikörperstatus im Eluat und Serum vor und nach der Transplantation wurden vergleichend analysiert. Anschließend wurde die Beziehung zwischen den Antikörper-Befunde und den klinischen Daten der Patienten untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Patientendaten und Nierenorgane

Für die 103 Patienten war das Ergebnis der HLA-Testung der Spender und Empfänger, sowie der Antikörperstatus vor und nach Nierentransplantation bekannt. Von den 103 Organen fielen 58 Nierenexplantate auf männliche und 45 auf weibliche Patienten. Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation betrug 44.8 Jahre, die Altersspanne lag dabei zwischen 9 und 68 Jahren. Die Verteilung der durchgeführten Transplantationen bezogen auf das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation ist in der Abb. 2.1 dargestellt.

Zwanzig der in der Studie eingeschlossenen Patienten wiesen Vortransplantationen auf. Bei 61 von 103 Patienten wurden Erythrozytenkonzentrate transfundiert. Die Verteilung der Grunderkrankungen der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation zeigt die Tabelle 2.1.

Insgesamt errechnete sich eine durchschnittliche HLA-Mismatch-Rate von 2,14, die als die Anzahl der Fehlpaarungen von HLA-Merkmalen zwischen Spender und Empfänger definiert ist. Die Mismatch-Rate betrug 1,54 für die HLA-Klasse I Antigene bzw. 0,54 für HLA-Klasse II Antigene.

Die 103 Nierenorgane wurden direkt nach der Explantation in den Transplantationszentren Essen und Bochum eingefroren und bei -20°C aufbewahrt. Die Lagerungszeit bis zur Aufarbeitung der Nierenorgane betrug durchschnittlich 3,32 Jahre (1 Tag bis maximal 12 Jahre).

Das mittlere Transplantatüberleben lag bei 770 Tagen. 33 Organe wurden hyperakut, d.h. innerhalb der ersten 3 Tage abgestoßen, 19 Nieren wurden akut, d.h. nach maximal 90 Tagen abgestoßen, dagegen überlebten 51 Transplantate länger als 90 Tage.

Die 103 Nierentransplantationen wurden in dem Zeitraum 1978 bis 1998 durchgeführt. Die Patientendaten sind in der Tabelle 2.2 zusammengefasst.

2.2 Material und Reagenzien

2.2.1 Lymphozytotoxizitätstest (LCT)

Für die Identifizierung zytotoxischer Alloantikörper in den Niereneluaten wurde zunächst der standardisierte Lymphozytotoxizitätstest nach NIH-Verfahren (NIH: engl. „National Institute of Health“), angewendet. Für den Antikörpernachweis sind HLA-getestete Zellen notwendig; diese wurden mit im Institut für Immunologie hergestellten HLA-Testplatten oder auch mit kommerziellen HLA-Testplatten der Fa. BAG (BAG Health Care, Lich) zur Bestimmung der HLA-Klasse I Merkmale ebenfalls im LCT untersucht.

Das Zellpanel für den Antikörpernachweis mittels LCT wurde aus frisch gewonnenen Lymphozyten zusammengestellt. Für die Auswertung der Testergebnisse wurden ein inverses Phasenkontrastmikroskop und ein Computeranalyse-System (Lambda Scan Plus, One Lambda Inc.) eingesetzt.

2.2.2 Lamda Antigen Tray (LAT™, One Lambda Inc.)

Die Eluate und Serumproben der Empfänger vor bzw. nach Transplantation wurden mittels Lamda Antigen Tray (LAT™, Firma One Lambda Inc., Los Angeles, CA, USA) auf HLA-Antikörper untersucht.

Die ELISA-Testplatten im Terasaki-Mikrotest-Format beinhalten in den verschiedenen Vertiefungen definierte Mengen affinitätsgereinigter HLA-Antigene. Diese Antigene wurden im LAT-M™ kombiniert, um den Nachweis von IgG-Antikörper gegen ein Panel verschiedener HLA-Klasse I und Klasse II-Spezifitäten zu ermöglichen. Das LAT-M Antigenpanel ist in der Tabelle 2.3 dargestellt.

Der gemischte HLA-Klasse I und Klasse II Assay LAT-M (für engl. „mixed“) identifizierte im Rahmen der Voruntersuchung positive und negative Proben, eine Bestimmung der HLA-Spezifität war anschließend in der Hauptuntersuchung mittels LAT-P (für engl. „principal“) möglich.

Ein PRA-Wert im ELISA wurde aus der Anzahl der Vertiefungen mit positiven Reaktionen dividiert durch die Gesamtzahl der Antigenpräparate im Testpanel berechnet.

2.2.3 B-Screen™ Enzymimmunoassay (Genetic Testing Institute)

Alle Eluate wurden zusätzlich mittels ELISA B-Screen™ Verfahren (Genetic Testing Institute, Brookfield, USA) auf HLA-Klasse II Antikörper untersucht. Diese ELISA-Testplatten im gewöhnlichen 96er Format trugen ebenfalls in den verschiedenen Vertiefungen definierte Mengen affinitätsgereinigter HLA-Klasse II Antigene. Dieser gemischte HLA-Klasse II Assay identifizierte positive bzw. negative Eluate.

2.3 Methoden

2.3.1 Elution der Antikörper aus den Nierenorganen

Anteile der explantierten Nierenorgane mit einem Gewicht von mindestens 50g bis maximal 180g wurden nach einer modifizierten Methode nach Lerner (1967) aufgearbeitet. Dabei wurde das aufgetaute Teilorgan mit einem Skalpell in kleine Stücke zerkleinert und mittels eines Ultra-Turax Mixers homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat in PBS+0,1%NaN₃ (pH 7,2) bei 4°C für 10 min. so oft zentrifugiert, bis der Überstand klar war. Hierzu waren im Durchschnitt 4 bis 5 Waschgänge notwendig. Das Sediment wurde in gleichem Volumen einer 0,1M Glycin-HCl Lösung aufgenommen und mit einer HCl-Lösung auf pH 2.3 eingestellt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 4°C wurde die Suspension für 10 min bei 1500 g erneut zentrifugiert und der Überstand mit 1,0 M NaOH Lösung neutralisiert (pH 7,2).

Anmerkung: Für die ersten 25 Eluate wurde statt einer 1,0 M NaOH Lösung eine 0,1 M Tris HCl Lösung verwendet, welches eine weitere Verdünnung der Eluate verursacht hat.

Das so gewonnene Eluat wurde danach bei 4°C für 15 Min. bei 2000 g zentrifugiert. Zur Proteinkonzentration der Eluate wurde eine Fällung nach Jonak (1981) mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (NH₄)₂SO₄ durchgeführt. Die trübe Lösung wurde zentrifugiert,

die präzipitierten Proteine anschließend mit 0,5ml PBS+0,1%NaN₃ aufgenommen und gegen PBS in fünfmaligem Wechsel für ca. 12 Stunden dialysiert.

Alle Eluate wurden im LCT und im ELISA auf die Präsenz von HLA Klasse I und Klasse II Antikörpern analysiert und bei -30°C konserviert.

2.3.2 Antikörpernachweis im Lymphozytotoxizitätstest (LCT)

Der standardisierte LCT ist die klassische Nachweismethode für HLA-Antikörper im Serum potentieller Empfänger oder für die immunologische Überwachung des Transplantates nach der Transplantation (Terasaki, 1964). Das Prinzip des LCT besteht darin, dass sich spezifische Antikörper an die membranständigen HLA-Antigene von Lymphozyten binden. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex aktiviert das dem System zugefügte Komplement, was zur Lyse der Lymphozyten führt. Nach Zugabe des Farbstoffes (Ethidiumbromid oder EB) diffundiert dieser durch die perforierten Lymphozyten-Membranen und färbt diese Zellen durch Einlagerung in die DNA rot an (positive Reaktion). Wenn kein membranständiger HLA-Antigenkomplex entstanden ist, erscheinen die Lymphozyten durch die Färbung mit Acridin-Orange (AO) hellgrün, da dieser Farbstoff die intakte Zellmembran passieren kann (negative Reaktion). Die Beurteilung der lysierten, bzw. der vitalen Lymphozyten erfolgt mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop.

Für einen Antikörpernachweis mittels LCT ist ein Panel von HLA-getesteten Lymphozyten notwendig. Die HLA-Klasse I Testung der Lymphozyten erfolgte wie folgt: In jeder Kavität der Testplatten waren 1 µl Serum unter ca. 6 µl. Decköl vorgelegt, welches spezifische HLA-Antikörper enthielt. Zur besseren makroskopischer Kontrolle wurden die HLA-Antikörper Lösungen mit Phenolrot gefärbt und zur Konservierung mit 0,1% Natriumazid versetzt. Jede Testplatte enthält zusätzliche Positionen mit Negativ- und Positivkontrollen. Die HLA-Testplatten wurden anschließend mit je 1 µl Zellsuspension pro Kavität verimpft und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 6 µl mit Ethidiumbromid / Acridin-Orange Lösung versetztem Kaninchenkomplement pro Kavität zugegeben und weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 6 µl Stopplösung (Hämoglobininlösung 5% EDTA in PBS) pro

Kavität. Die Stopplösung verhindert den weiteren Reaktionsablauf und deckt störende Hintergrundfluoreszenz ab. Das Ablesen der Testplatten und die Auswertung der Testresultate erfolgte mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop und der Software Lambda Scan Plus (One Lambda Inc.).

Die HLA-getesteten Lymphozyten wurden anschließend für den Antikörpernachweis in den Eluaten eingesetzt.

Für die Identifizierung zytotoxischer Alloantikörper in den Niereneluaten wurde der LCT wie folgt angewendet: In jeder Kavität der Testplatten wurde jeweils 1 µl Eluat unter ca. 6 µl. Decköl vorgelegt. Jede Testplatte enthielt zusätzliche Positionen mit Negativ- und Positivkontrollen (humane Serumproben, die in Voruntersuchungen ausgetestet wurden). Auf diese Weise erfolgte die Herstellung einer ausreichenden Anzahl von Testplatten (56 Stück). Die Testplatten wurden anschließend mit je 1 µl Zellsuspension (Zellkonzentration eingestellt auf $4 \times 10^6/\text{ml}$) pro Kavität verimpft und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 6 µl mit Ethidiumbromid/Acridin-Orange Lösung versetztem Kaninchenkomplement pro Kavität zugegeben und weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 µl Stopplösung (Hämoglobinlösung und 5% EDTA in PBS) pro Kavität. Die Stopplösung verhinderte den weiteren Reaktionsablauf und deckt störende Hintergrundfluoreszenz ab.

Die Niereneluat wurden auf diese Weise gegen ungetrennte Lymphozyten von 56 unverwandten, HLA-getesteten Probanden auf zytotoxische Alloantikörper mit und ohne den Zusatz von Dithiothreitol (DDT) getestet. DTT reduziert die Disulfidbrücken und inaktiviert die IgM-Antikörper.

Abschließend erfolgte das Ablesen der Ergebnisse mit dem inversen Phasenkontrastmikroskop, wobei die rote Fluoreszenz als positive zytotoxische Reaktion und die hellgrüne Fluoreszenz als negative Reaktion protokolliert wurde.

Gemäß den Richtlinien der European Federation for Immunogenetics (EFI) wurden die prozentualen Anteile an lysierten Zellen pro Testreaktion in die nachfolgend dargestellten Score-Werte umgewandelt:

Zytolyse	Score	Bewertung
0 - 10%	1	negativ
11 - 20%	2	+/- , schwache zytotoxische Reaktion
21 - 50%	4	++ , mäßig ausgeprägte zytotoxische Reaktion
51 - 80%	6	+++ , starke zytotoxische Reaktion
81 - 100%	8	++++ , sehr starke zytotoxische Reaktion
	0	nicht ablesbar

Der Anteil positiver Reaktionen an der Gesamtzahl des Lymphozytenpanels wurde als Panelreaktivität (Panel reaktive Antikörper, PRA) bezeichnet und in Prozente angegeben. Seren mit einem PRA-Wert > 5% wurden als positiv bewertet und aufgrund des Reaktionsmusters mit allen Testlymphozyten hinsichtlich der HLA-Antikörperspezifität über ein Computerprogramm (Lambda Scan Plus, One Lambda Inc.) analysiert. Mit diesem Programm lassen sich Korrelationskoeffizienten zwischen den Reaktionen der einzelnen Niereneluate und den an Testzellen vorhandenen HLA-Merkmalen ermitteln. Der Korrelationskoeffizient (R-Wert) errechnet sich aus folgender Formel:

$$R = \frac{X^2}{N}$$

wobei der Chi-Quadrat-Wert aus den Einträgen in der Vierfelder-Tafel ermittelt wird.

$$X^2 = \frac{(ad-bc)^2 n}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Beispiel:

		Serum/ Eluat Reaktion		
		pos	neg	
HLA-Antigen an der Testzelle	pos	++	+ -	a+b
	neg	- +	--	c+d
		a+c	b+d	n=a+b+c+d

Ein Niereneluat mit einem R-Wert = 1 für z.B. HLA-A1 bedeutet, dass das getestete Eluat ohne Ausnahme Antikörper gegen HLA-A1 aufweist, d.h. mit allen Testzellen, die das Merkmal HLA-A1 tragen, positiv reagiert hat.

HLA-Antikörper, die gegen die HLA-Mismatch Antigene zwischen Spender und Empfänger gerichtet sind, werden als donorspezifische oder spenderspezifische HLA-Antikörper bezeichnet. Beispielhaft ist der Patient Nr. 43 (Tab. 3.1) dargestellt, bei dem die Spezifität anti-HLA-A2 identifiziert wurde. Der Merkmal HLA-A2 ist in diesem Fall ein Mismatch Antigen zwischen Spender und Empfänger.

Patient Nr. 43

Empfänger: HLA-A1, A19; HLA-B7, B49

Spender: HLA-A2, A19; HLA-B7, B14

Der LCT erfasst zytotoxische Antikörper der IgG1, IgG3 und IgM-Klassen, einschließlich auto-Antikörper und zytotoxischer non HLA-Antikörper. Nicht detektiert werden Komplement unabhängige und somit nicht zytotoxische Antikörper der IgG4 und IgG2-Klassen. Antikörper der IgA-Klasse können das Komplement ebenfalls nicht aktivieren und führen daher im LCT nicht zu einer positiven Reaktion.

Bei Vorliegen einer hohen Panelreaktivität kann eine Verdünnung von Serumproben bzw. der Eluate eine Spezifizierung von hochtitrigen Antikörpern erleichtern. In der vorliegenden Arbeit wurden daher bei einigen Eluaten Verdünnungen in den Stufen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 und 1:128 für den Antikörpernachweis im LCT eingesetzt.

2.3.3 Antikörpernachweis im ELISA

Alternativ zu dem klassischen LCT wurden in den letzten Jahren Verfahren zum Nachweis von HLA-Antikörpern etabliert, die auf dem ELISA-Prinzip beruhen. Die 103 Niereneluat wurden im „Lambda Antigen Tray“ (LAT™) ELISA, auf das Vorhandensein von HLA-Klasse I und II Antikörpern gemäß den Anweisungen des Herstellers des Testkits untersucht. Zusätzlich erfolgte eine vergleichende Untersuchung der Eluate auf ausschließlich HLA-Klasse II Antikörper mittels B-Screen™ Test.

Die Festphase der Testkits ist mit HLA-Klasse I und II Antigenen (LAT™) bzw. nur HLA-Klasse II Antigenen (B-Screen™) beschichtet, die aus Zelllinien von B-Lymphozyten isoliert und aufgereinigt wurden. Spezifische, gegen HLA gerichtete Antikörper in den Eluaten, können an diese Festphasenantigene binden. Nach einem Waschschrift, bei dem alle nicht gebundenen Eluatbestandteile entfernt wurden, erfolgte die Zugabe von mit alkalischer Phosphatase markiertem anti-human-IgG Zweitantikörper als Konjugat. In einem weiteren Waschvorgang wurde anschließend überschüssiges Konjugat entfernt. Durch Zugabe eines chromogenen Substrates entstand in nächsten Schritt eine Farbreaktion, die nach Abstoppen photometrisch ausgewertet wurde. Eine Definition der Antikörperspezifitäten (LAT-P™) erfolgte durch eine Analyse der Reaktionsmuster.

Der methodische Testablauf des LAT™ geschah wie folgt: Je 10µl Serumkontrolle (Positivkontrolle), Antikörperversdünnungslösung und im Verhältnis 1:3 verdünntes Eluat wurden in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei 20-25°C wurde der Platteninhalt abgeworfen, Waschpuffer zugegeben und der Platteninhalt erneut abgeworfen. Pro Vertiefung erfolgte die Zugabe von 10µl Konjugat. Nach 40 Minuten Inkubationszeit wurde der Waschvorgang wiederholt. Danach erfolgte die Gabe von 10µl kolorimetrischem Enzymsubstrat (Komponenten A und B) in jede Vertiefung. Nach 10-15 Minuten lichtgeschützter Inkubation wurde die Farbentwicklung mit Stoppreagenz gestoppt. Die Ergebnisse wurden innerhalb einer Stunde mit einem auf Terasaki-Plattenformat eingerichteten ELISA-Reader gemessen. Die Messung erfolgte bei der Wellenlänge 630 nm, eine Auswertung der Reaktionsmuster mittels Auswertesoftware der Fa. One Lambda.

Mittels LAT-M™ in einer 1:3 Verdünnung wurden zuerst die 103 Eluate im Vorscreening auf die Präsenz von HLA-Klasse I und II Antikörpern geprüft. Ein vergleichendes Vorscreening auf ausschließlich HLA Klasse II Antikörper wurde im B-Screen™ ELISA-Verfahren der Fa. GTI ebenfalls durchgeführt. Nur diejenigen Eluate, die in dem Vorscreening positive Ergebnisse zeigten, wurden im Hauptscreening (LAT-P™) bei einer Verdünnung von 1:5 bis 1:10 weiter getestet. Auf diese Weise erfolgte eine Spezifizierung von bindenden HLA-Klasse I und II Antikörpern in den Eluaten.

In der beschriebenen Methodik wurden zusätzlich die verfügbaren, konservierten Serumproben vor Transplantation von 40 Empfängern im ELISA LAT-M™ und LAT-P™ auf die Präsenz von HLA-Klasse I und II Antikörper untersucht. Die Patientenseren waren bereits im Rahmen der die Transplantation vorbereitenden Diagnostik mittels LCT untersucht worden. Ziel der Untersuchung der Serumproben prä TX mittels ELISA war, eventuelle im LCT nicht identifizierte Antikörper zu detektieren. Diese ergänzenden Resultate wurden mit den bekannten, im LCT ermittelten Serum-Antikörper-Resultaten sowie mit den Antikörper-Ergebnissen in den Eluaten verglichen.

2.3.4 Messung der IgG-, IgA- und IgM- Konzentrationen

Die Messung der IgG, IgA- und IgM- Konzentrationen in den Niereneluaten erfolgte immunonephelometrisch. Der Nephelometrie liegt das Prinzip der Lichtstreuung von Antigen-Antikörper-Komplexen zugrunde. Dabei wird das Antigen, welches hier die IgG, IgA- und IgM Moleküle darstellen, mit einer konstanten Menge an Antikörpern in einer Küvette inkubiert. Anschließend wird ein Lichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers durch die Küvette geschickt und das Ausmaß der Lichtstreuung mit Hilfe eines Detektors bestimmt. Die Ermittlung der Antigenkonzentration erfolgt mittels einer Eichkurve, die durch Messung der Lichtstreuung in Antigen-Lösungen bekannter Konzentrationen aufgestellt wurde.

2.3.5 Messung der Proteinkonzentrationen

Die Messung der Proteinkonzentration im Eluat wurde photometrisch mit dem Photometer ELX 808 (Fa. Bio-Tek) unter der Anwendung der Mikro-Win 3.0 Auswertesoftware durchgeführt. Die Photometrie nutzt die Abschwächung eines Lichtstrahls in farbigen Lösungen zur Konzentrationsbestimmung in der Messprobe. Mit Hilfe der Mikro-Win Software wurden die Proteinkonzentrationen in den Eluaten errechnet.

2.3.6 Testung von 4 Eluaten auf Leukozyten- und Thrombozytenantikörper

Vier Eluate mit positiven Reaktionen im LCT bei negativen ELISA Resultaten wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen-Marburg (Leitung: Prof. Dr. med. G. Bein) auf Leukozyten- und Thrombozyten-Antikörper untersucht. Zur Identifizierung der Leukozyten- und Thrombozyten-Antikörper in den Niereneluaten wurde der Granulozyten-immunofluoreszenztest (GIFT), der Granulozytenagglutinationstest (GAT), der Lymphozytenimmunofluoreszenztest (LIFT) und der Thrombozyten-adhesionsimmunofluoreszenztest (TAIFT) verwendet. Beim GAT werden Testgranulozyten mit dem zu untersuchenden Eluat auf einer Mikrotiterplatte inkubiert. Granulozytenantikörper induzieren eine Aggregation, die an einem Umkehrmikroskop beurteilt wird. Im GIFT, LIFT und TAIFT werden mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers membrangebundene Granulozyten-, Lymphozyten oder Thrombozyten-Antikörper nachgewiesen. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop (GIFT, TAIFT) oder mittels Durchflusszytometer (LIFT).

2.3.7 Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism für Windows™ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde für zwei zu vergleichenden Gruppen der t-Test verwendet. Für drei zu vergleichende Gruppen die zum Teil keine Normalverteilung aufwiesen wurde eine nichtparametrische ANOVA (Analysis of Variance oder Analyse der Varianzen) nach Kruskal–Wallis durchgeführt. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses der nichtparametrischen ANOVA ($p < 0,05$) wurde anschließend der multiple nichtparametrische Vergleichstest nach Dunn verwendet. Die Beziehungen zwischen den Panelreaktivitäten im LZT und ELISA sowie zwischen Immunglobulinkonzentrationen und Transplantatüberleben wurden mittels einer bivariaten Korrelationsanalyse untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Antikörpernachweis im Lymphozytotoxizitätstest (LCT)

Die Untersuchung der 103 Niereneluatate auf zytotoxische HLA-Klasse I Antikörper mittels LCT zeigte in 30 (29%) der Eluate zytotoxische Antikörper (Tab. 3.1, Nr. 1-30) wovon 15 Eluate donorspezifische HLA-Klasse I Antikörper enthielten (Tab. 3.1, Nr. 1-13, 27, 28). In 15 Eluaten wurden nicht donorspezifische HLA-Klasse I Antikörper detektiert (Tab. 3.1, Nr. 14-26, 29, 30). Dagegen wurden in 73 (71%) der getesteten Eluate keine zytotoxischen Antikörper gefunden.

Alle Eluate mit positivem HLA-Klasse I Antikörperstatus sind in der Abbildung 3.1 dargestellt. Die HLA-Klasse I Antikörper-Spezifitäten, die ausschließlich im LCT nachweisbar waren, sind in der Tabelle 3.1 linksseitig dargestellt, mittig befinden sich die Spezifitäten, die durch beiden Testverfahren identifiziert wurden und rechtsseitig solche, die nur im ELISA zu erkennen waren.

Um die Antikörper-Spezifität in positiven Eluaten besser zu definieren, wurden sie in 3 unterschiedlichen Verdünnungen getestet, so dass präferentiell nur noch hochtitrige Antikörpern spezifiziert wurden. Nach Verdünnung wurden in 15 Eluaten donorspezifische Antikörper nachgewiesen. In 9 aus 15 Eluaten wurden donorspezifische Antikörper sowohl in unverdünnten als auch in verdünnten Eluaten nachgewiesen. In 2 Eluaten konnten donorspezifische Antikörper nur in der letzten Verdünnung identifiziert werden, während das unverdünnte Eluat keine Spezifizierung erlaubte (Tab. 3.1, Nr. 27 und 28).

Bei 3 Eluaten war die Panelreaktivität 100%, so dass eine Antikörperspezifizierung erst nach Verdünnung möglich war. Bei 2 der 3 Eluate mit einem PRA-Wert von 100% konnten bei einer Verdünnung bis 1:32 (Patient 65), oder 1:128 (Patient 22) donorspezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die Eluate mit im LCT nachgewiesenen donorspezifischen Antikörpern wurden in der Tabelle 3.1 hervorgehoben (fett gedruckt und unterstrichen).

Bei 15 Eluaten konnten auch nach Verdünnung keine donorspezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Das Eluat Nr. 22 (Patient 57, Tab. 3.1) wurde trotz eines niedrigen

PRA-Wertes von 2% als positiv bewertet, weil Antikörper mit gleicher HLA-Spezifität (anti-HLA-A11) auch im ELISA-Verfahren detektiert wurden (Abschnitt 3.2). Das Eluat Nr. 24 (Patient 69, Tab. 3.1), hatte einen PRA-Wert von 4% und zeigte im Serum vor Transplantation die gleiche Spezifität anti-HLA-A9, weswegen auch dieser Fall als positives Eluat interpretiert wurde. Bei den Eluat Nr. 23 und 30, (Tab. 3.1) waren aufgrund hoher PRA-Werte von 92% bzw. 100% eine Verdünnung bis 1:64 erforderlich.

In 4 von 14 Eluat mit nicht donorspezifischen HLA-Antikörpern (Nr. 22-24, 26, Tab. 3.1) konnten die gleichen Antikörper-Spezifitäten auch im Serum der Patienten nach Transplantation nachgewiesen werden, worauf im Abschnitt 3.6 näher eingegangen wird.

Sechs von 14 Patienten mit nicht donorspezifischen Antikörpern in den Eluat hatten bereits eine vorausgegangene Transplantation empfangen. Patienten mit Vortransplantationen sind in der Tabelle 3.1 mit einem Stern (*) markiert. Bei dem Patienten 14 wurde die erste Transplantation ohne HLA-Mismatche durchgeführt. Bei dem Patienten 96 erklären die Mismatche HLA-A1 und HLA-B12 der ersten Transplantation ebenfalls nicht die Spezifität anti-HLA-A29, die im Eluat detektiert werden konnte. Bei dem Patienten 65 wurden im Eluat sowohl donorspezifische (anti-HLA-A2, B51) als auch nicht donorspezifische anti-HLA-A28 Antikörper gefunden. HLA-A28 war ein Mismatch-Antigen der ersten Transplantation, somit sind die letztgenannten Antikörper zwar als donorspezifisch zu interpretieren, allerdings nicht für das für die Gewinnung des Eluats herangezogene Nierenorgan. Bei 6 vortransplantierten Patienten mit nicht donorspezifischen Antikörpern im Eluat waren die HLA-Daten zu den Vortransplantationen nicht bekannt (Patienten 23, 55, 69, 89, 91, 98). Mögliche Antikörper, die gegen frühere Spender-HLA-Antigene gerichtet sind, kann man daher in diesen Fällen nicht auszuschließen.

Neun aus 14 Patienten (64%) mit nicht donorspezifischen HLA-Antikörpern erhielten nachweislich Bluttransfusionen, die als mögliche Quelle einer Immunisierung gegen HLA nicht ausgeschlossen werden können.

Auffallend bei Patient Nr. 95 war der Nachweis eines HLA-B7 spezifischen Eluat Antikörpers im LCT und auch im ELISA (vgl. Abschnitt 3.2), obwohl der Patient selbst das Merkmal HLA-B7 trug. Eine mögliche Erklärung wäre ein falsch bestimmtes HLA-

Muster des Empfängers oder ein das Vorliegen eines seltenen HLA-B7 Allels (z.B HLA-B*0703) beim Empfänger, so dass Antikörper gegen das häufige HLA-B*0702 Allel des Spenders gebildet wurden.

3.2 HLA-Klasse I Antikörpernachweis im ELISA (LAT™, One Lambda)

In 70 (68%) der mittels ELISA untersuchten 103 Niereneluat waren keine HLA-Klasse I Antikörper nachweisbar. Die Anzahl der im ELISA positiv getesteten Eluate mit HLA-Klasse I Antikörpern betrug 33 aus 103 (32%). In 19 der 103 Eluate wurden donorspezifische HLA-Klasse I Antikörper gefunden (Nr. 1-8, 12-18, 31-34, Tab. 3.1), in 12 Eluat waren die HLA-Antikörper nicht donorspezifisch (Nr. 10, 19-26, 35-37, Tab. 3.1). In einem Eluat war bei einem PRA-Wert von 100% keine HLA-Spezifizierung möglich (Nr. 11, Tab. 3.1). Ein weiteres Eluat, welches im Vorscreening positiv für HLA-Klasse I Antikörper war, konnte aufgrund einer zu geringen Eluatmenge im Hauptscreening nicht weiter untersucht werden (Nr. 9, Tab. 3.1).

Der Anteil von im ELISA nachgewiesenen donorspezifischen Antikörpern (19 aus 103) war höher als im LCT (13 aus 103). Diese mittels ELISA detektierten donorspezifischen Antikörper wurden ebenfalls in der Tab. 3.1 hervorgehoben (fett gedruckt und unterstrichen).

In 13 Fällen konnte keine Übereinstimmung zwischen den Mismatch-Antigenen des Spenders und der Antikörper-Spezifität im Eluat festgestellt werden. Bei 3 Patienten mit nicht donorspezifischen Antikörpern im Eluat lagen die gleichen Antikörper-Spezifitäten im Eluat und im Serum vor Transplantation (Nr. 23 und 26, Tab. 3.1), bzw. nach Transplantation (Nr. 69, Tab. 3.5) vor. Diese Patienten werden im Abschnitt 3.6 ausführlicher beschrieben.

In 5 Eluat fanden sich anti-HLA-B7, -B27 bzw. anti-HLA-A2 Antikörper, obwohl die Empfänger selbst diese Antigenmerkmale tragen. Nur in einem Fall war die Antikörperspezifität (anti-HLA-B7) auch in LCT nachweisbar (vgl. Abschnitt 3.1).

3.3 HLA-Klasse I Antikörper: Vergleich zwischen LCT und ELISA

Ein Vergleich der Ergebnisse der zwei unterschiedlichen Testsysteme zum Antikörpernachweis ist in der Abb. 3.3 dargestellt. Zwei Drittel der Eluate (n=66, 64%) waren in beiden Testsystemen negativ. Bei insgesamt 26 Eluaten (25%) wurden sowohl im LCT als auch im ELISA HLA-Klasse I Antikörper nachgewiesen. Vier Eluate (4%) waren nur im LCT positiv und im ELISA negativ, weitere 7 Eluate (7%) reagierten nur im ELISA positiv und im LCT negativ. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 3.3 und Tab. 3.1 dargestellt.

3.3.1 HLA-Klasse I Spezifizierung im LCT und im ELISA

Von 26 Eluaten mit in beiden Testverfahren positivem Antikörper-Status hatten 7 Eluate donorspezifische Antikörper, die sowohl im LCT als auch im ELISA identifiziert detektiert wurden (Nr. 1-7, Tab. 3.1). In 3 weiteren Fällen wurden zwar mit den beiden Methoden donorspezifische Antikörper gefunden, die jedoch unterschiedlichen Spezifitäten hatten (Nr. 8, 12-13, Tab. 3.1). Bei 3 Patienten wurden im Eluat nur mittels LCT donorspezifische Antikörper gefunden, während sich im ELISA zwar Antikörper fanden, die jedoch nicht donorspezifisch waren (Nr. 9-10, Tab. 3.1), bzw. ein Eluat wegen nicht ausreichender Eluatmenge im ELISA nicht auf eine HLA-Spezifizierung getestet wurde (Nr. 11, Tab. 3.1). Fünf mal wurden nur mittels ELISA donorspezifische Antikörper detektiert (Nr. 14-18, Tab. 3.1). In 6 Eluaten wurden nicht donorspezifische Antikörper sowohl im LCT als auch im ELISA mit gleicher Spezifität detektiert (Nr. 19-24, Tab. 3.1) und in 2 Proben wurden nicht donorspezifische Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität in den beiden Methoden gefunden (Nr. 25-26, Tab. 3.1).

Von 37 Eluaten, die im LCT und/oder ELISA positiv für HLA-Klasse I Antikörpern waren, konnten bei 24 Eluaten Spezifitäten gegen den Spender des explantierten Nierenorgans detektiert werden (Nr.1-18, 27, 28, 31-34).

Bei dem Eluat Nr. 13, Tab. 3.1 fanden sich Antikörper, die gegen alle nicht mit dem Empfänger übereinstimmenden HLA-A und -B Merkmale des Spenders gerichtet waren. Auch im Serum des Empfängers, welches nach der Transplantation untersucht wurde,

fanden sich einige dieser HLA-Spezifitäten (vgl. Abschnitt 3.6). Bei 6 weiteren Eluaten wurden Antikörper gefunden, die gegen mehrere nicht zwischen Spender und Empfänger übereinstimmende HLA-A und B-Merkmale des Spenders gerichtet waren (Nr. 3, 11, 12, 15, Tab.3.1).

3.3.2 Panelreaktivität der HLA-Klasse I Antikörper im LCT und im ELISA

Die Korrelationsanalyse der sowohl im LCT als auch im ELISA ermittelten Panelreaktivitäten für HLA-Klasse I Antikörper (% PRA), ergab einen Korrelationskoeffizient von $r = 0.95$ ($p < 0.001$) und somit eine gute Korrelation (Abb. 3.4).

Auffallend ist, dass im ELISA durchschnittlich ein höherer Wert (52% PRA) als im LCT mit 46% PRA ermittelt wurde (t-Test, $p=0,91$).

3.3.3 LCT positive / ELISA negative Eluate

Eine Serie von 4 Eluaten (4%) zeigte ausschließlich im LCT eine positive Reaktion mit PRA-Werten zwischen 6 und 100%, während sie im ELISA negativ waren (Nr. 27-30, Tab. 3.1). Positive Reaktionen durch ein Vorliegen von DTT-sensitiven IgM-Antikörpern konnte durch die Zugabe von DTT ausgeschlossen werden. In 2 dieser 4 Eluate wurden bei einer Verdünnung von 1:4 donorspezifische Antikörper gefunden, während das unverdünnte Eluat einen negativen Antikörper-Status aufwies. Möglicherweise handelt es sich um ein falsch negatives Resultat aufgrund eines zu hohen Antikörpertiters im Eluat. Zwei weitere Eluate waren im LCT positiv, wobei keine Donorspezifitäten gefunden wurden. Bei dem Eluat Nr. 30, Tab. 3.1 war bei einem PRA-Wert von 100% eine Verdünnung bis 1:64 für eine erfolgreiche Spezifizierung der Antikörper erforderlich.

Eine Sensibilisierung vor der Transplantation lag bei 2 der 4 Patienten vor (Nr. 27 und 29, Tab. 3.1). Nach der Transplantation war der Antikörper-Status im Serum bei diesen Patienten negativ.

Bei dem Patienten 42 handelte sich um die dritte Transplantation, die übrigen Patienten waren erstmalig transplantiert. Transfusionen erhielten nur 2 der 4 Patienten (Patienten 42 und 77).

Die Eluate Nr. 28 und 29 (Tab. 3.1) zeigten in den im Kapitel 2.2.5 beschriebenen Immunfluoreszenztests keine auffälligen Reaktionen, somit konnten Antikörper gegen Leukozyten und Thrombozyten ausgeschlossen werden. Positive Reaktionen in den o.g. Testverfahren wurden in dem Eluat Nr. 30 beobachtet. Mit den glykoproteinspezifischen Enzymimmuntests MAIPA und MAIGA konnten starke HLA-Klasse I Antikörper identifiziert werden.

3.3.4 LCT negative / ELISA positive Eluate

Bei 7 (7%) der 103 Eluate konnten im ELISA HLA-Antikörper mit PRA-Werten zwischen 2% und 76% gezeigt werden, während im LCT keine zytotoxischen Antikörper nachweisbar waren (Nr. 31-37, Tab. 3.1). Donorspezifische Antikörper zeigten 4 dieser 7 Eluate (Nr. 31-34, Tab. 3.1). Bei den Eluaten Nr. 32 und 34 handelt sich um multispezifische Antikörper, die gegen alle HLA-Merkmale gerichtet sind. Bei 2 der Eluate mit donorspezifischen Antikörper waren diese auch im Serum nach Transplantation zu finden (Nr. 31 und 32, Tab. 3.1).

In den anderen 3 Eluaten fanden sich ebenfalls HLA-Klasse I Antikörper, die jedoch nicht gegen die Spender HLA-Merkmale gerichtet waren (Nr. 35-37, Tab. 3.1). Diese 3 Patienten waren vor der Transplantation nicht immunisiert und nach der Transplantation hatte nur ein Patient einen positiven Antikörper-Status im Serum. Der Patient 84 wurde wiederholt transplantiert. Zwei von drei Patienten mit unspezifischen Antikörpern erhielten Bluttransfusionen (Nr. 35, 36, Tab. 3.1).

3.4 HLA Klasse II-Antikörpernachweis im ELISA (LAT und B-Screen™ Enzymimmunoassay)

Die 103 Eluate wurden im Vorscreening mit 2 unterschiedlichen ELISA Verfahren (LAT, One Lambda Inc., und B-Screen™ Enzymimmunoassay, Genetic Testing Institute, GTI)

auf die Präsenz von HLA-Klasse II Antikörpern untersucht. Im Vorscreening waren in 26 Eluaten mit beiden Methoden (LAT™ und B-Screen™) HLA-Klasse II Antikörper nachweisbar. Sechs Eluate reagierten im B-Screen™ negativ und LAT™ positiv, weitere 7 Eluate waren im B-Screen™ positiv und im LAT™ negativ.

Im Hauptscreening zur HLA-Klasse II Spezifizierung, welches ausschließlich mittels LAT™ durchgeführt wurde, konnten nur in 4 Eluaten donorspezifische HLA-Klasse II Antikörper identifiziert werden, in 21 Eluaten fanden sich demgegenüber HLA-Klasse II Antikörper, die nicht gegen Spender HLA-Klasse II Merkmale gerichtet waren. In 7 Eluaten konnte keine HLA-Klasse II Spezifität bestimmt werden. Diese Ergebnisse sind in Abb. 3.5 und Tab. 3.2 dargestellt.

Bei dem Patienten Nr. 37 (Tab. 3.2), fanden sich donorspezifische Antikörper, die gegen HLA-DR und HLA-DQ Antigene gerichtet sind. In 2 Eluaten waren donorspezifische anti-HLA-DR Antikörper und in einem weiteren Eluat anti-HLA-DQ Antikörper zu identifizieren (Nr. 2-4, Tab. 3.2).

Auffällig ist ein viel geringerer Anteil an Eluaten mit donorspezifischen HLA-Klasse II Antikörpern als mit donorspezifischen Klasse-I Antikörpern. Ein möglicher Grund hierfür liegt darin, dass in einigen Fällen die HLA-DQ Merkmale der Spender nicht bekannt waren und sich daher nicht klären ließ, ob es sich um donorspezifische anti-HLA-DQ Antikörper handelte.

Betrachtet man die Ergebnisse für die HLA-Klasse I und II Antikörper gemeinsam, so wurden in ca. der Hälfte der Fälle (48 aus 103 Eluaten) im LCT und/oder ELISA HLA-Klasse I und/oder Klasse II Antikörper im Eluat festgestellt. In den meisten Fällen (22 aus 48 positiven Eluaten) handelte es sich um eine Mischung von HLA-Klasse I und HLA-Klasse II Antikörpern. In 15 Eluaten wurden ausschließlich HLA-Klasse I Antikörper gefunden, in nur 11 Eluaten waren ausschließlich Antikörper gegen HLA-Klasse II Antigene zu finden. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 3.6 zusammengefasst

3.5 Eluate mit LCT und ELISA negativem Antikörperstatus

In 55 aus 103 Eluaten (53%) konnten mit keiner der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Methoden HLA Antikörper nachgewiesen werden.

3.6 Antikörperstatus im Patientenserum vor und nach der Nierentransplantation

Serumproben von Patienten, die auf eine Organtransplantation warten, werden in der Laborroutine regelmäßig auf HLA-spezifische Antikörper untersucht, um eine mögliche Sensibilisierung gegen HLA zu erfassen. Der Serum-Antikörperstatus vor und in einigen Fällen auch nach der Nierentransplantation war bei den Patienten, von denen die 103 Eluate gewonnen wurden, im Rahmen dieser perioperativen Screening-Diagnostik bekannt.

Insgesamt wiesen 43 der 103 Patienten (41%) einen positiven Antikörperstatus im Serum vor der Transplantation auf. Bei einer getrennten Betrachtung des Antikörperstatus für die Patienten mit bzw. ohne aus dem Explantat eluierbaren HLA-Klasse I und/oder Klasse II Antikörpern hatten 30 Patienten (29%) ohne eluierbare Antikörper einen positiven Serum-Antikörperstatus vor der Transplantation, wohingegen 56 der Patienten (55%) mit HLA-Klasse I oder II Antikörper im Eluat vor Transplantation einen positiven Antikörperstatus aufwiesen.

Von besonderem Interesse sind Proben mit gleicher HLA Antikörper-Spezifität im Serum vor bzw. nach Transplantation und im Eluat. Diese übereinstimmenden Spezifitäten sind in der Tab. 3.1 durch Fettdruck hervorgehoben. So wurden in 17 Fällen HLA-Antikörper mit gleicher Spezifität im Serum und im Eluat gefunden. In 8 der 17 Proben wurden donorspezifische Antikörper im Eluat und im Serum festgestellt (Eluate Nr. 3, 5, 6, 11, 13, 18, 31, 32, Tab. 3.1), bei den anderen 9 Eluaten handelte sich um nicht donorspezifische Antikörper (Eluate Nr. 1, 10, 12, 14, 15, 22, 23, 24, 26, Tab. 3.1).

Bei 40 der 103 Patienten wurden Empfänger-Seren im Zustand nach erfolgter Transplantation eingefroren und im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mittels LAT™ auf HLA-Antikörper getestet. Für die übrigen 63 Patienten lagen keine Empfänger-Seren im Zustand nach TX vor; diese Seren wurden jedoch im Rahmen der vorbereitenden

Transplantationsdiagnostik vor der TX mittels LCT untersucht. Ähnlich wie bei den Eluaten wurden in dem Hauptscreening (LAT-P™) nur die Serumproben weiter spezifiziert, die im Vorscreening (LAT-M™) positiv waren. Im Vorscreening waren 17 der 40 getestete Seren für HLA-Klasse I und 18 für HLA-Klasse II positiv. HLA-Klasse I Spezifitäten konnten im Hauptscreening in 9 Seren bestimmt werden, HLA-Klasse II Antikörper waren in 10 Seren zu spezifizieren. In 2 Seren wurden nicht donorspezifische HLA-Klasse I Antikörper (Patient 69, 91, Tab. 3.1) und in 2 Proben ebenfalls nicht donorspezifische HLA-Klasse II Antikörper (Patient 98, 14, Tab. 3.2) mit gleicher Spezifität wie im Eluat, nachgewiesen. Bei 3 Patienten wurden mittels ELISA donorspezifische HLA-Klasse I Antikörpern im Serum gefunden. In den entsprechenden Eluaten waren indessen keine HLA Antikörper mittels LCT und ELISA zu identifizieren.

3.7 Transplantatüberleben und HLA-Antikörper-Status der Eluate

Als Transplantatfunktionszeit oder Transplantatüberleben wurde der Zeitraum zwischen dem Tag der Transplantation und dem Tag definiert, an dem der Patient wegen erneuter Nichtfunktion des Organs wieder hämodialysiert werden musste. Der Tag der wieder einsetzenden Hämodialyse war somit nicht mit dem Zeitpunkt der Explantation des irreversibel abgestoßenen Organs identisch. Um die Beziehung zwischen dem Transplantatüberleben und dem Antikörperstatus in den Niereneluaten aufzuzeigen, wurden die Eluate nach ihrem HLA Antikörperstatus in 3 Gruppen unterteilt:

Gruppe 1: Eluate ohne HLA Antikörper (n=55)

Gruppe 2: HLA-Klasse I und /oder II Antikörper positive Eluate, wobei die detektierten HLA-Spezifitäten nicht mit den Merkmalen des Spenders übereinstimmten, d.h. ohne Donorspezifität (n=22)

Gruppe 3: Eluate mit donorspezifischen HLA-Klasse I und/oder II Antikörpern (n=26).

Für jede Gruppe wurde die Transplantatüberlebenszeit ermittelt. Das durchschnittliche Transplantatüberleben betrug 689 Tage in der Gruppe der Eluate mit negativem Antikörperstatus, 919 Tage für die Gruppe der Eluate mit nicht donorspezifischen Antikörpern und 813 Tage für die Gruppe der Eluate mit donorspezifischen Antikörpern. Die Präsenz von Antikörpern im Eluat, die nicht gegen den Spender gerichtet waren, war

mit der längsten Transplantatüberlebenszeit assoziiert. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (nichtparametrische ANOVA, $p=0,78$, n.s.). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.7 dargestellt.

Eine getrennte Analyse unter Berücksichtigung der angewandten Screening Methode (LCT oder ELISA) und der HLA-Antikörper-Klasse (I/II) ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede (nichtparametrische ANOVA, $p=0,79$ bzw. $p=0,78$ für HLA-Antikörper-Klasse I getestet im LCT bzw. ELISA und $p=0,84$ für HLA-Antikörper-Klasse II Antikörper getestet im ELISA). Diese Resultate finden sich in der Abbildung 3.8.

Eine weitere Unterteilung der Resultate dieser Arbeit in Eluate mit ausschließlich HLA-Klasse I Antikörpern ($n=15$), mit ausschließlich HLA-Klasse II Antikörpern ($n=11$) und mit HLA-Klasse I und II Antikörpern ($n=22$) ergab folgende durchschnittlichen Transplantatüberlebenszeiten: 989 Tage für die erste Gruppe mit Klasse I Antikörpern, 849 Tage für die Gruppe mit HLA-Klasse II Antikörper und 861 Tage wenn beide HLA-Klasse I und II Antikörperklassen nachweisbar waren (nichtparametrische ANOVA, $p=0,58$, n.s.).

Auffällig war ein statistisch signifikant besseres Transplantatüberleben für die LCT negativen / ELISA positiven Eluate im Vergleich zu den Eluaten ohne HLA-Antikörper (T-Test, $p=0.008$).

3.8 HLA-Mismatch-Rate und HLA-Antikörper-Status der Niereneluat

Einen anderen Zusammenhang zeigt die Gegenüberstellung von HLA-Mismatch-Rate und HLA-Antikörper-Status in den Niereneluaten bei der gleichen Gruppeneinteilung wie unter 3.7 beschrieben. Die höchste Mismatch-Rate (3,0) ist eindeutig der Gruppe mit eluierbaren donorspezifischen HLA-Antikörpern zuzuordnen. Für die Gruppe der Eluate mit nicht zu spezifizierenden Antikörpern betrug dieser Wert 2,0 und bei den Eluaten mit negativem Antikörperstatus wurde eine Mismatchrate von 1.9 ermittelt. Statistisch signifikant waren die Unterschiede zwischen der Gruppe mit donorspezifischen HLA-Antikörpern verglichen mit der Gruppe der nicht zu spezifizierenden Antikörpern bzw. der Gruppe mit negativen

Eluaten (nichtparametrische ANOVA, Dunn Test, $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.10 dargestellt.

In der Abbildung 3.11 wird die gleiche Fragestellung unter Berücksichtigung der angewandten Methode (LCT oder ELISA) und der HLA-Antikörper (Klasse I oder Klasse II) dargestellt. Erneut findet sich die höchste Mismatch-Rate bei den Eluaten mit donorspezifischen Antikörpern. Für die Eluate mit im LCT und/oder ELISA nachgewiesenen donorspezifischen HLA-Klasse I Antikörpern waren die Unterschiede bezüglich der Mismatch-Rate ebenfalls signifikant (nichtparametrische ANOVA, Dunn Test, $p < 0,05$).

In der Gruppe der Eluate mit donorspezifischen HLA-Klasse II Antikörpern konnte keine erhöhte HLA-Mismatch-Rate gezeigt werden (nichtparametrische ANOVA, $p = 0,07$).

3.9 IgG, IgA und IgM -Konzentration und Proteinkonzentration in den Niereneluaten

Die Gesamt-Proteinkonzentrationen wurden in den Niereneluaten photometrisch gemessen. Die nephelometrisch bestimmten IgG, IgA und IgM-Konzentrationen im Niereneluat wurden entsprechend der gemessenen Gesamt-Proteinkonzentration im Eluat auf eine Konzentration von 1mg/dl korrigiert. Diese Ergebnisse sind in der Tab. 3.3 dargestellt.

Eine Korrelation zwischen Transplantatüberleben und gemessenen IgG, IgA und IgM-Konzentrationen in den entsprechenden Eluaten zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang (Korrelationsanalyse IgG: $p = 0,64$, IgA: $p = 0,62$, IgM: $p = 0,31$, Tab. 3.4 und Abb. 3.12).

4. Diskussion

Die immunologische Wirt-gegen-Transplantat-Reaktion (Host-versus-Graft Reaktion) stellt trotz verbesserter Immunsuppressiva und Berücksichtigung optimaler HLA Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger weiterhin die führende Ursache für die irreversible Nierenabstoßung dar. Während bei der hyperakuten Abstoßung die humoralen Mechanismen durch präformierte spenderspezifische Alloantikörper eine zentrale Rolle spielen, ist der Beitrag der Antikörper-vermittelten Immunantwort im Rahmen der akuten und chronischen Abstoßung noch nicht endgültig geklärt. Die transplantierte Niere ist der entscheidende Ort, wo sich die humorale und/oder zelluläre Abstoßungsreaktion manifestiert. Das Gefäßendothel des transplantierten Organs ist das erste mögliche Ziel der humoralen Immunreaktion.

Obwohl in der Literatur zahlreiche Berichte über eluierbare Antikörper aus irreversibel abgestoßenen Niereneluaten zu finden sind, waren mit wenigen Ausnahmen in den bisher vorliegenden Arbeiten die Fallzahlen der untersuchten Nieren niedrig oder die Charakterisierung der Antikörper unzureichend.

4.1 Vergleich der Methoden: Lymphozytotoxizitätstest (LCT) und ELISA

Zurzeit ist der LCT die eingesetzte Standardmethode für die Kreuzproben-Testung unmittelbar vor einer Transplantation und für den Suchtest auf HLA-spezifische Antikörper im Serum potentieller Empfänger oder auch nach einer Transplantation für die immunologische Überwachung des Transplantats.

Der LCT erfasst zytotoxische Antikörper der IgG1, IgG3 und IgM Klasse, einschließlich Autoantikörper, die gegen HLA oder andere sog. non-HLA Antigene gerichtet sein können. Für die Transplantation irrelevante Autoantikörper, die meistens der IgM Klasse angehören, können nach Zugabe von DTT zum Testansatz differenziert untersucht werden. (Ettenger, 1981; Ting, 1983). Generell zeigte sich jedoch, dass IgM Antikörper im Fall einer wiederholten Transplantation einen negativen Einfluss auf das Transplantatergebnis haben können (Taylor, 1989; Kermann, 1991; Ten Hoor, 1993). Nicht detektiert werden im

LCT komplementunabhängige, nicht zytotoxische Antikörper der IgG4, IgG2, und auch der IgA Klassen. Eine Differenzierung zwischen HLA-spezifischen Antikörpern und den anderen zytotoxischen Antikörpern (sog. non-HLA Antikörper) ist nicht möglich. Der Nachweis von HLA-Klasse II Antikörpern durch dieses Verfahren ist methodisch aufwändig und erfordert eine Thrombozyten-Absorption von anti-HLA Klassen I Antikörpern sowie eine B-Zell-Anreicherung im Testansatz. Ein Einfluss lymphozytotoxischer Immunsuppressiva nach erfolgter Transplantation (z.B. die Gabe von ATG) auf das Testresultat muss bei der Testinterpretation beachtet werden. Weitere Nachteile der Methode sind die Notwendigkeit einer großen Anzahl von HLA-typisierten vitalen Lymphozyten, die Variabilität des Komplementsystems sowie eine subjektive Bewertung der Testresultate am Mikroskop.

Alternativ stehen etablierte Verfahren für das HLA-Antikörperscreening zur Verfügung, die auf dem ELISA Prinzip beruhen (zum Beispiel LAT-M™/LAT-P™, One Lambda Inc. oder B-Screen™, GTI). Die kommerziell erhältlichen ELISA-Formate können selektiv Antikörper nachweisen, die sowohl gegen HLA-Klasse I als auch gegen HLA-Klasse II Antigene gerichtet sind. Im Gegensatz zum LCT werden im ELISA zusätzlich zu den IgG1 und IgG3-Klassen auch komplementunabhängige Antikörper der IgG4 und IgG2 Klassen erfasst. Nicht erfasst werden IgM Antikörper und mögliche zytotoxische non HLA-Antikörper. Die Tatsache, dass die ELISA-Methode HLA-spezifisch ist und nach aktueller Datenlage möglicherweise doch klinisch relevante non HLA-Antikörper nicht identifiziert, kann jedoch als Nachteil der Methode angesehen werden. (Opelz, 2005). Die ELISA-Verfahren werden durch die immunsuppressive Therapie nicht beeinflusst. Ferner bieten die ELISA-Formate gute Automatisierungs- und Standardisierungsmöglichkeiten beispielsweise des Antigen-Panels und der eingesetzten Reagenzien. Außerdem sind sie weniger zeitaufwändig.

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen eine gute Korrelation der Panelreaktivitäten ($r = 0.95$, $p < 0.001$) zwischen dem LCT (NIH-Verfahren) und dem ELISA-Verfahren (LAT-M™/LAT-P™, One Lambda Inc.) hinsichtlich der Identifikation von HLA-Klasse I Antikörpern aus. Diskrepanzen zwischen den zwei Methoden entstehen durch eine höhere Sensitivität des ELISA-Verfahrens, durch die Detektion von komplementunabhängigen Antikörpern im ELISA oder durch eine Reaktion von zytotoxischen Antikörpern im LCT gegen non-HLA-Antigene.

Bei dem Vergleich der Antikörper-Spezifitäten ergaben sich weniger gut korrelierbare Ergebnisse. Solche Unterschiede erklären sich dadurch, dass es sich um zwei fundamental differente analytische Methoden mit unterschiedlichen Ansatzpunkten handelt: die „Membranebene“ im Fall des LCT und die „Molekularebene“ für den ELISA.

Ähnliche Ergebnisse im Sinne von gut korrelierbaren PRA-Werten und teilweise unterschiedlichen Spezifitäten im LCT und ELISA werden in der Literatur beschrieben (Buelow, 1995; Zachary, 1995; Kermann, 1997; Schönemann, 1998; Worthington, 1998; Marteen, 2000). Arbeiten, die den LCT mit dem hier eingesetzten ELISA-Verfahren LAT, One Lambda Inc. vergleichen, berichten ebenfalls über eine gute Übereinstimmung der PRA-Werte und über eine höhere Sensitivität des ELISA-Verfahrens (Magee, 2001; Parissiadis, 2001; Uboldi de Capei, 2002). Mittlerweile besteht allgemeiner Konsens in der Auffassung, dass der LCT und das ELISA-Verfahren als zwei komplementäre Methoden zu betrachten sind, die sich bei der Identifikation von transplantationsrelevanten Antikörpern gegenseitig ergänzen.

4.2 HLA-Klasse I und II Antikörper in den Niereneluaten

Die vorliegende Arbeit konnte in ca. der Hälfte der untersuchten Niereneluaten HLA-Klasse I und/oder Klasse II Antikörper nachweisen. Die Spezifität war in 46% Fällen (22 aus 48 positiven Eluaten) gegen beide HLA-Antigenklassen gerichtet. In 15 Eluaten (31%) wurden ausschließlich HLA-Klasse I Antikörper gefunden, in nur 11 Eluaten (23 %) waren Antikörper ausschließlich gegen HLA-Klasse II Antigene gerichtet. Diese Eluate entstammten Nierenorganen, die überwiegend chronisch abgestoßen wurden. HLA-Klasse II Antikörper sind auch nach aktueller Datenlage in Rahmen der chronischen Abstoßung beteiligt, während HLA-Klasse I Antikörper im Rahmen der akuten Abstoßung eine entscheidene Rolle spielen (Fuller et al. 1999). Die generelle Präsenz von HLA-Klasse I und/oder Klasse II Antikörpern in den Niereneluaten war mit einem verlängerten Transplantatüberleben korreliert.

4.3 Donorspezifische Antikörper in den Niereneluaten

Insgesamt waren in ca. der Hälfte der positiven Eluate donorspezifische HLA-Klasse I und/oder Klasse II Antikörper zu finden. Der Anteil von ca. 50% donorspezifischen Antikörpern entspricht dem Ergebnis einer sich ebenfalls mit Niereneluaten befassenden Promotionsarbeit aus dem Institut für Immunologie (U. Vögeler, 1991), wie auch der viel geringere Anteil an donorspezifischen HLA-Klasse II Antikörpern im Vergleich zu den HLA-Klasse I Antikörpern. Anzumerken ist der methodische Unterschied bezüglich dem Nachweis von HLA-Antikörpern. In der vorliegenden Arbeit wurde ein ELISA Test verwendet, während in der vorherigen Promotionsarbeit (Dr. Vögeler) der Nachweis von HLA-Klasse II Antikörpern mittels LCT mit angereicherten B-Lymphozyten und verlängerten Inkubationszeiten erfolgte. Diese Methode ist jedoch nicht strikt auf einen Nachweis von HLA-Klasse II Antikörpern beschränkt, da B-Lymphozyten in nicht unerheblichen Mengen HLA-Klasse I Merkmale exprimieren und auch die Thrombozytenadsorption der Eluate Antikörper gegen HLA-Klasse I Merkmale in Einzelfällen unzureichend entfernen kann.

Die reine Präsenz von donorspezifischen Antikörpern im Niereneluat zeigte in der vorliegenden Arbeit, anders als erwartet, keinen negativen Einfluss auf die Transplantatfunktionszeit. Nur für die Eluate mit donorspezifischen HLA-Klasse II Antikörpern war ein tendenziell schlechteres Transplantatüberleben zu beobachten, jedoch war die Anzahl dieser Eluate gering. Obwohl es keinen Konsens über die klinische Bedeutung der HLA-Klasse II Antikörper gibt, ist der negative Einfluss der donorspezifischen HLA-Klasse II Antikörper auf die Überlebenszeit der transplantierten Nieren anerkannt (Lederer, 1996; Feucht, 1996; Schönemann, 1998; Pollinger, 2007).

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von donorspezifischen Antikörpern und der HLA-Mismatch Rate zwischen Spender und Empfänger konnte jedoch klar gezeigt werden. Die Nierentransplantate mit donorspezifischen Antikörpern im Niereneluat wiesen eine statistisch signifikant höhere Mismatch-Rate auf als solche Transplantate ohne bzw. mit nicht zu spezifizierenden Antikörpern im Eluat.

Bei einem Vergleich des Antikörperstatus im Eluat mit dem im Serum nach der Transplantation fällt auf, dass donorspezifische Antikörper häufiger im Eluat zu

identifizieren sind als im Serum nach Transplantation. In 17 von 24 Eluaten mit donorspezifischen Antikörpern ließen sich diese Antikörper nur im Eluat und nicht im Serum nachweisen. Diese Konstellation könnte sich durch die Absorption der im peripheren Blut zirkulierenden Antikörper durch das übertragene Organ erklären. In der Literatur wird über einen Verlust der donorspezifischen Antikörpern in der Peripherie in den ersten Tagen nach Transplantation bei retrospektiv positivem Crossmatch berichtet. Der Absorptionseffekt durch das transplantierte Organ scheint vom Titer der unmittelbar vor der Transplantation vorhandenen Antikörper zu sein (Groth, 1995; Supon, 2001).

4.4 Nicht donorspezifische Antikörper in den Niereneluaten

Ungefähr die Hälfte (48%) der positiven Eluate wiesen nicht donorspezifische Antikörper auf. In 11 Fällen zeigte sich eine Konstellation, in der im Serum nach Transplantation und im Eluat gleiche HLA-Spezifitäten ohne Beziehung zu den Mismatch-Antigenen der Spender nachweisbar waren. In einem Fall wurde das Organ trotz einer sehr guten HLA-Übereinstimmung ohne HLA-Mismatches zwischen Empfänger und Spender, hyperakut abgestoßen.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unabhängig von der verwendeten Methode (LCT/ELISA), oder der HLA-Antikörperklasse (I/II), so hatten die Nierenorgane mit eluierbaren HLA-Antikörpern ohne Donorspezifität die längste Transplantatüberlebenszeit.

Es stellt sich die Frage, wie der hohe Anteil an nicht donorspezifischen Antikörpern bei Patienten mit längeren Funktionszeiten zu erklären ist. Die ersten Kontaktflächen des transplantierten Nierenorgans für das Immunsystem des Empfängers sind die Endothelzellen der Gefäße. Vorstellbar ist, dass das Transplantat zirkulierende HLA-spezifische Antikörper über die Fc-Rezeptoren auf Endothelzellen unspezifisch abfängt, und somit das Nierenorgan wie ein Schwamm Antikörper bindet, ohne schädigendes Komplement zu aktivieren. Auf diese Weise kann möglicherweise eine Toleranz erzeugt werden.

Die Induktion von HLA-Antikörpern kann durch Transplantationen, HLA-inkompatible Bluttransfusionen und/oder Mehrfachschwangerschaften erfolgen, wobei die

Transplantation im Vergleich zur Transfusion häufiger zu höheren Sensibilisierungsraten führt (Zhou, 1991). Mit zunehmender Transfusionsfrequenz steigt der prozentuale Anteil sensibilisierter Patienten, gleichzeitig nimmt der Anteil von Patienten mit breiter maximaler Panelreaktivität zu. Die meisten der Patienten mit nicht donorspezifischen Antikörper im Niereneluat erhielten mehrfachen Bluttransfusionen, in 5 Fällen handelte es sich um eine wiederholte Transplantation. Im Fall einer wiederholten Transplantation können aktuelle HLA-Spezifitäten in einem Patienten auch gegen frühere inkompatible HLA-Merkmale des vorherigen Spenders gerichtet sein. Solche Antikörper-Spezifitäten sind für die hier untersuchten Eluate nicht spenderspezifisch. Sie werden aber im Patienten weiterhin gebildet, obwohl die Zielantigene des vorherigen Transplantats nicht mehr vorhanden sind, denn ein nicht mehr funktionsfähiges bereits transplantierte Organ wird in der Regel bei der Retransplantation entnommen.

Aktuelle Daten zeigen, dass die humorale Immunantwort gegen das Nierentransplantat hauptsächlich die Bildung von HLA-Klasse I Antikörpern mit Spezifitäten gegen sog. „public“ Epitope beinhaltet, die auf verschiedenen Mismatch-HLA Molekülen des Spenders vorkommen. Ein Spender-Epitop kann die Produktion eines breiten Spektrums von Antikörperspezifitäten induzieren. (Mao, 2007; Piazza, 2007). Solche Antikörper entstehen in den meisten Fällen nach Erkennung eines „einzelnen“ Epitops des Spenders, obwohl eine Vielzahl von Mismatches auf Aminosäureebene zwischen Spender und Empfänger vorliegen. Weiterhin wurden einzelne Aminosäuren als Hauptepitope identifiziert, die zur Bildung von polyspezifischen Antikörpern führten. Die Immunogenität eines Epitops hängt von dem Aminosäuretypen an einer bestimmten Position der Determinanten ab. Donorspezifische und nicht donorspezifische HLA-Antikörper können gleichzeitig entstehen und gegen einen gemeinsamen Epitop des Spenders gerichtet sein (Mao, 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit waren in 25 Fällen donorspezifische und nicht donorspezifische HLA-Antikörper gleichzeitig im Eluat zu identifizieren. Nur in einem Fall (Eluat Nr. 47) fanden sich ausschließlich donorspezifische HLA-Antikörper.

Nach Kontakt mit den Transplantatantigenen kommt es zur Bildung von Alloantikörpern, die selber sog. anti-idiotypische Antikörper induzieren können, welche wiederum gegen die Alloantikörper gerichtet sind. In der Literatur werden „protektive“ Antikörper beschrieben, die anti-idiotypische Antikörper umfassen. Die Daten einer umfangreichen

multizentrischen Studie zeigen, dass ein erhöhter IgA-anti-Fab Autoantikörper Titer vor Transplantation mit einer sehr guten Transplantatüberlebenszeit assoziiert ist (Susal, 2000). In Abhängigkeit der Immunantwort durch Bildung von zytotoxischen Antikörpern nach wiederholten Bluttransfusionen unterscheidet man Patienten mit transfusionsinduzierten zytotoxischen Antikörpern, sog. „high responders“, und solche ohne zytotoxische Antikörper („low responders“). Die Patienten, die nach Bluttransfusionen einen erhöhten IgA-anti-Fab-Titer und keine zytotoxische Antikörper entwickelten, haben eine statistisch signifikant bessere Transplantatüberlebenszeit als die Patienten mit niedrigem IgA-anti-Fab und zytotoxische Antikörper (Süsal, 1995). Auch weitere Autoren konnten zeigen, dass die Präsenz von IgA anti-HLA Klasse I im Serum vor Transplantation mit einem Titer im ELISA > als 10% das Transplantatergebnis signifikant verbessert (Kermann, 1996). Darüber hinaus wurde berichtet, dass Patienten mit IgA Nephropathie ein niedrigeres Risiko für eine Abstoßungsreaktion dadurch aufweisen, dass IgA anti-HLA Antikörper die Wirkung von HLA-Antikörper der IgG-Klasse neutralisieren könnten (Lim, 1993). Weitere Studien konnten ein besseres Transplantatüberleben bei Patienten mit IgA Nephropathie nicht bestätigen (Ponticelli, 2001; Andresdottir, 2005).

Ein Zusammenhang zwischen der generellen IgA-Konzentration im Niereneluat und der Transplantatüberlebenszeit konnte bei den vorliegenden Daten jedoch nicht festgestellt werden, allerdings war die Anzahl der IgA positiven Eluate gering. Nur einer der untersuchten Patienten hatte als primäre Nierenerkrankung eine IgA Nephropathie. In diesem Fall waren in dem entsprechenden Eluat keine IgA-Antikörper feststellbar.

4.5 Nicht zytotoxische HLA-Antikörper in den Niereneluaten

Die HLA-Klasse I Antikörper, die nur im ELISA (LAT, One Lambda) nachweisbar sind und keine Zytotoxizität im LCT aufweisen, sind als nicht zytotoxische oder nicht Komplement aktivierende HLA-Antikörper zu klassifizieren. Antikörper der IgG4, IgG2 und IgA Klasse, die das Komplementsystem nicht oder nur partiell aktivieren, können im klassischen LCT keine positive Reaktion auslösen.

Eine solche Konstellation fand sich bei 7 der 103 Eluaten. In 4 der 7 Eluaten mit nicht zytotoxischen HLA-Antikörpern handelte es sich um donorspezifische Antikörper, in den anderen 3 Eluate wurden spezifische HLA-Antikörper ohne Beziehung zu den Mismatch-Antigenen des Spenders gefunden. Weitere 3 Patienten (Patienten Nr. 52, 57 und 69) hatten im Eluat eine grenzwertige Panelreaktivität im LCT und eine deutlich positive Reaktion im ELISA, so dass diese Eluate schwache zytotoxische HLA-Antikörper enthalten. Sechs aus 7 Nierenorganen mit eluierbaren nicht zytotoxischen HLA-Antikörpern wurden chronisch abgestoßen. Die Präsenz von nicht zytotoxischen HLA-Antikörpern im Eluat war mit einem deutlich besseren Transplantatüberleben assoziiert. Eine mögliche Erklärung für die Identifikation von nicht zytotoxischen HLA-Antikörpern überwiegend in Verbindung mit chronischer Abstoßung wäre die Sekretion von IgG2 und IgG4 im späteren Verlauf der humoralen Immunantwort. IgM ist der erste Immunglobulin-Isotyp, der von naiven B-Lymphozyten nach Antigenkontakt produziert wird, gefolgt von IgG1 und IgG3 und erst später von nicht Komplement-aktivierenden IgG2 und IgG4 (Malisan, 1996). Eine weitere mögliche Erklärung für das Auftreten von nicht zytotoxischen HLA-Antikörpern wäre der Immunglobulin Klassenwechsel von Komplement-aktivierenden IgG1 und IgG3 zu den Komplement-unabhängigen IgG2 und IgG4. Des Weiteren könnten nicht zytotoxische Antikörper als ein sog. „Bystander“-Effekt im Verlauf einer Abstoßungsreaktion auftreten und nicht als die eigentliche Ursache für die Abstoßungsreaktion.

Bei dem Patienten Nr. 84 mit nicht zytotoxischen HLA-Antikörpern im Eluat kam es trotz einer sehr guten Übereinstimmung im HLA System (Mismatch-Rate 0) zu einer hyperakuten Abstoßungsreaktion innerhalb eines Tages. Im Serum des Empfängers konnten sowohl vor als auch nach der Transplantation keine Antikörperspezifität identifiziert werden.

In der Literatur wird über nicht zytotoxischen HLA-Antikörper überwiegend in Verbindung mit hyperakutem/akutem Transplantatabstoßungsgeschehen berichtet. Hierbei sind meistens präformierte, nicht zytotoxische HLA-Antikörper gemeint, die der Kreuzprobe vor der Transplantation entgehen, das Mismatch-Antigen des Transplantates aber erkennen und zu einer frühen akuten vaskulären Abstoßung führen. Nicht Komplement aktivierende Antikörper könnten an Fc-Rezeptoren zytotoxischen Zellen

binden und durch antikörperabhängige zellulär-vermittelte Zytolyse zur Transplantatabstoßung führen (Karuppan, 1992).

Kissmeyer-Nielsen (1969) und Karuppan (1992) zeigten, dass bei einem Anteil von Patienten mit hyperakuter Transplantatabstoßung komplementunabhängige HLA-Antikörper der IgG2, IgG4 und IgA Klassen im Serum vor der Transplantation nachweisbar waren.

Weiterhin wurde beschrieben, dass donorspezifische, nicht zytotoxische HLA-Antikörper der IgG2 Klasse, die nach Bluttransfusionen induziert werden können, retrospektiv im Serum vor der Transplantation identifiziert werden konnten und trotz negativer Kreuzprobe zur akuten Transplantatabstoßung (Nani-Costa, 1996) führten. Schließlich konnte mehrfach gezeigt werden, dass die generelle Präsenz von nicht zytotoxischen HLA-Antikörpern einen negativen Einfluss auf das Transplantatüberleben haben kann (Worthington, 1998; Fuller, 1999; Kermann, 1997).

Insgesamt zeigen die publizierten Daten im Übereinstimmung mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Resultaten, dass sich aus irreversibel abgestoßenen Nierentransplantaten nicht zytotoxische, teilweise auch donorspezifische HLA-Antikörper isolieren lassen, die eine deutliche Relevanz für den Transplantationsverlauf haben. Darüber hinaus scheinen nicht zytotoxische Antikörper, d.h. das Komplement nicht direkt aktivierende Antikörper, bei der chronischen Abstoßungsreaktion beteiligt zu sein.

4.6 Zytotoxische non HLA-Antikörper in den Niereneluaten

Die 4 LCT positiven/ELISA negativen Niereneluaten könnten durch zytotoxische non HLA-Antikörper erklärt werden. Das Eluat Nr. 101 reagierte stark im LCT mit einem PRA-Wert von 100%. Der Serum-Antikörperstatus vor und nach der Transplantation war in diesem Fall negativ. Das Transplantat wurde akut nach 30 Tagen irreversibel abgestoßen. Die anderen 3 Eluate mit non-HLA-Antikörpern wurden chronisch abgestoßen. Von den LCT positiven/ELISA negativen Eluaten konnten nur bei dem Patienten 101 Leukozyten- und Thrombozyten- Antikörper im Eluat nachgewiesen werden.

Polymorphe non HLA-Antigene sind auf Endothelialzellen, Monozyten oder Keratinozyten vorhanden, wohingegen man sie auf Lymphozyten bisher nicht eindeutig charakterisiert hat. Das beschriebene Endothelial-Monozyten Alloantigensystem (Moraes, 1977) ist in manchen Fällen bei der akuten Abstoßung HLA-identischer (Cerilli, 1983) oder nicht identischer (Baldwin, 1983, Sumitran-Karuppan, 1997) Nierentransplantate beteiligt.

In der bereits erwähnten vorausgegangenen Promotionsarbeit (Vögeler, 1991) wurde gezeigt, dass Monozyten-spezifische Antikörper aus irreversibel abgestoßenen Nierenorganen eluierbar waren und einen signifikant negativen Effekt auf die Transplantatfunktion hatten. Untersuchungen von Patientenserum nach Transplantation zeigen, dass ELISA negative/LCT positive Patienten ein schlechteres Transplantatüberleben aufweisen als solche die ELISA positiv/LCT negativ waren (Christiaans et al, 2000).

Im Rahmen der CTS (Collaborative Transplant Study, G. Opelz, Heidelberg) wurden über 4000 HLA-identisch Nieren transplantierte Patienten untersucht. Opelz konnte eindeutig zeigen, dass Empfänger mit zytotoxischen Antikörpern vor der Transplantation trotz HLA-Identität zum Spender ein reduziertes Langzeitüberleben im Vergleich zu den Empfängern ohne zytotoxische Antikörper bei ebenfalls HLA-Identität zum Spender aufwiesen (Opelz, 2005). Somit ist der non-HLA Immunität eine hohe Relevanz im Bereich der chronischen Abstoßung zuzuschreiben. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass HLA-Antikörper zusammen mit non HLA-Antikörpern auftreten und mit Epitopen der der sog. Minor-Histokompatibilitäts-Antigene reagieren. Andererseits wird heutzutage diskutiert, dass eine erhöhte Panelreaktivität vor der Transplantation auch bei HLA-identischen Spender/Empfänger Konstellation ein Indikator für eine allgemein gesteigerte Immunantwort im Empfänger darstellt. Bei solchen Patienten führt eine Inkompatibilität der Minor-Histokompatibilitäts-Antigene zu einer stärkeren, späten Transplantatschädigung, die vermutlich nicht direkt durch Antikörper vermittelt wird, die im Empfängerserum vor der Transplantation vorhanden sind (Opelz, 2005).

Die Mechanismen, durch die non HLA-Antikörper Organ schädigend wirken, sind noch nicht vollständig geklärt. Solche Antikörper können sowohl durch Lyse über das Komplementsystem (Baldwin et al, 1995), als auch durch antikörperabhängige zellulär-

vermittelte Zytotoxizität zur Transplantatabstoßung führen (Miltenburg et al. 1989, Yard et al. 1993). Andere Berichte über akute Rejektionen zeigen, dass non HLA-Antikörper auch ohne Zytotoxizität die Endothelzellen aktivieren, d.h. es erfolgt eine spezifische Bindung und eine physiologische Reaktion darauf (Lucchiari et al. 2000). Im Rahmen der akuten renalen Abstoßung wird die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ELAM-1 (endothelial leucocyte adhesion molecule-1) und PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) stark induziert. Diesen Molekülen, die zum Teil auch Polymorphismen aufweisen und somit spezifische Antikörper induzieren können, wird eine entscheidende Rolle im Rejektionsprozess zugeschrieben (v Villebrand et al. 1996).

4.7. Eluate mit negativem Antikörperstatus im LCT und ELISA

In ca. der Hälfte der Eluate konnten keine zytotoxischen oder nur bindenden HLA Antikörper identifiziert werden. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Eluate aus Nierenorganen gewonnen wurden, die ebenfalls aufgrund von Abstoßungen die Funktion eingestellt hatten. Abgestoßene Nierenorgane ohne eluierbare Antikörper könnten daher durch die Beteiligung von nicht antikörpervermittelten zellulären Abstoßungsmechanismen erklärt werden. Die zelluläre Immunantwort wird durch zytotoxischen T-Lymphozyten, aktivierten Makrophagen und NK-Zellen vermittelt und führt zu einer Zytolyse des transplantierten Organs zunächst ohne Beteiligung von Antikörpern. Antikörper können im Rahmen zellulärer Abstoßungsreaktionen sekundär auftreten, sind aber hier nicht die Ursache für die Abstoßung. Der Einfluss zellulärer Abstoßungsreaktionen könnte auch ein Grund für das Fehlen einer Korrelation zwischen dem Vorliegen donorspezifischer Antikörper und einer reduzierten Transplantatfunktionszeit in der vorliegenden Arbeit sein (siehe 4.3).

Eine weitere mögliche Erklärung für die Eluate mit negativem Antikörperstatus wäre, dass durch die Elution nicht immer die in den abgestoßenen Nierenorganen vorhandenen Antikörper isoliert werden konnten. Vorstellbar ist, dass Antikörper, die nur in niedrigen Konzentrationen in den Nierenorganen vorhanden waren, durch die Säureelution nicht oder nur unzureichend gewonnen werden konnten.

Auch war die Qualität der Nierenorgane durch variable Lagerungszeiten (zwischen 1 Tag und 12 Jahren) unterschiedlich. Die Zeiten von der Explantation bis zum Einfrieren des Organs waren ebenfalls variabel. Es ist zu beachten, dass keinerlei Konservierungslösung beigelegt wurde. Schließlich war auch das Gewicht der aufgearbeiteten Nierenorgane unterschiedlich: In der Regel wurde das gesamte Organ kryokonserviert, in wenigen Fällen lag jedoch nur ein Organteil vor. Möglich wäre, dass kleinere Organteile stärkere Einbußen bei der Haltbarkeit aufwiesen und anschließend weniger oder keine Antikörper isoliert werden konnten.

Letztlich besteht auch die Möglichkeit einer unklaren pathologischen Diagnostik, die in Einzelfällen Schädigungen im Transplantat durch nicht immunologische Faktoren wie chirurgische Komplikationen oder Perfusionsstörungen, die schließlich zur Transplantatabstoßung führten, unzureichend diagnostizierte. In solchen Fällen sind keine Antikörper in den Nierenorganen zu erwarten.

4.8. Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten eindeutig zeigen, dass nicht zytotoxische HLA-Antikörper aus irreversibel abgestoßenen Niereneluataten eluierbar sind. Anders als bisher angenommen sind die nicht zytotoxischen HLA-Antikörper insbesondere im Rahmen der chronischen Abstoßung von Bedeutung. Weitere Studien sind erforderlich, um die Relevanz dieser Antikörper auf das Transplantatüberleben genauer zu definieren.

Die vorliegende Arbeit beschränkte sich auf die Charakterisierung von eluierbaren Antikörpern aus irreversibel abgestoßenen Nierenorganen mittels LCT und ELISA. Heutzutage stehen beispielsweise mit der Durchflusszytometrie oder dem LuminexTM-Verfahren weitere, noch sensitivere Testverfahren zur Verfügung, die eine noch genauere Charakterisierung der Antikörper in den Eluataten erlauben. Zusätzlich werden für die neuen Testmethoden geringe Mengen an Probenmaterial benötigt, weshalb sie sich auch für die Untersuchung von über Säureelution gewonnenen Probenmaterials aus Nierenbiopsien eignen. Es konnte bereits publiziert werden, dass aus Biopsien von chronisch abgestoßenen Nieren HLA-Antikörper eluierbar waren und der Nachweis der direkt am Transplantat

gebundenen Antikörper mittels Elution somit eine mögliche Ergänzung zur Abstoßungsdiagnostik darstellen kann (Martin et al. 2005).

5. Zusammenfassung

Der Nachweis und die Charakterisierung von direkt im allogenen Nierentransplantat abgelagerten Antikörpern sind für die Abstoßungsdiagnostik von großer Bedeutung. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit aus 103 explantierten Nierenorganen, Proben durch Säure-Elution gewonnen und diese Eluate mittels Lymphozytotoxizitätstest (LCT) und ELISA auf die Präsenz von HLA-Antikörpern untersucht. Anschließend erfolgte eine Korrelation der Ergebnisse mit dem Transplantatüberleben der explantierten Nierenorgane.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in ca. der Hälfte der Fälle HLA Klasse I und/oder Klasse II Antikörper, einschließlich nicht zytotoxischer HLA-Antikörper und vermutlich auch zytotoxische non HLA-Antikörper aus irreversibel abgestoßenen Nierenorganen isoliert werden. Solche Antikörper wurden sowohl bei akut als auch bei chronisch abgestoßenen Nierenorganen identifiziert. Die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Testverfahren, LCT und ELISA, waren bezüglich der Panelreaktivitäten für HLA-Klasse I Antikörper gut korrelierbar, wohingegen die HLA-Spezifisierung der Antikörper Unterschiede zwischen den Methoden aufzeigte. Die ELISA Untersuchungen zeigten, dass in 46% der positiven Eluate die Antikörper gegen beide HLA-Antigenklassen gerichtet waren, wohingegen in 31% bzw. 23% der positiven Eluate ausschließlich HLA-Klasse I bzw. Klasse II Antikörper gefunden wurden. Der Anteil an donorspezifischen Antikörpern lag für HLA-Klasse I mit 50% der positiven Eluate deutlich höher als für HLA-Klasse II Antikörper (11%). Donorspezifische Antikörper waren häufiger im Eluat als im Serum der Empfänger nachweisbar. Die Präsenz von HLA-Klasse I und/oder Klasse II Antikörpern (mit oder ohne Donorspezifität) in abgestoßenen Nierenorganen war jedoch nicht mit einem reduzierten Transplantatüberleben assoziiert.

In 7 der 103 Eluate konnten nicht zytotoxische HLA-Antikörper nachgewiesen werden. Die Präsenz von nicht zytotoxischen Antikörpern in den Niereneluaten war mit einem verlängerten Transplantatüberleben korreliert. Offenbar sind nicht zytotoxische Antikörper bei der chronischen Abstoßungsreaktion beteiligt. Der Einsatz eines Verfahrens zum Nachweis nicht Komplement-bindender Antikörper erscheint in der Transplantationsdiagnostik sinnvoll.

6. Literaturverzeichnis

1. Andresdottir, M.B., Haasnoot, G.W., Doxiadis, I.I., Persijn, G.G., Claas, F.H. (2005): Exclusive characteristics of graft survival and risk factors in recipients with Immunoglobulin A nephropathy: a retrospective analysis of registry data. *Transplantation* 80, 1012-1118.
2. Baldwin, W.M., Soulillou, J.P., Class, F.H.J., Peyrat, M.A., van Es, L.A., van Rood, J.J. (1981): Antibodies to endothelial antigens in eluates of 88 human kidneys: correlation with graft survival and presence of T- and B-cell antibodies. *Transpl. Proc.* 13, 1547-1550.
3. Baldwin, W.M., Claas F.H.J., Paul, L.C., Springer, T.A., Hendriks, G.F.J., van Es, L.A., van Rood, J.J. (1983): All monocyte antigens are not expressed on renal endothelium. *Tissue Antigens* 21, 254.
4. Baldwin, W.M., Pruitt, S.K., Brauer, R.B., Daha, M.R., Sanfilippo, F. (1995): Complement in organ transplantation. *Transplantation* 59, 797.
5. Bryan, C.F., Martinez, J., Muruve, N., Nelson, P.W., Pierce, G.E., Ross, G., Shield, C.F., Warady, B.A., Aeder, M.I., Harrell, K.M., Helling, T.S., Luger, A.M (2001): IgM antibodies identified by a DDT-ameliorated positive cross match do not influence renal graft outcome but the strength of the IgM lymphocytotoxicity is associated with DR phenotype. *Clin. Transplantat.* 14, 28-35.
6. Buerlow, R., Mercier, I., Glanville, L., Regan, J., Ellingson, L., Janda, G., Claas, F., Colombe, B., Gelder, F., Grosse-Wilde, H., Orosz, C., Westenhoff, U., Voegeler, U., Monterio, F., Pouletty, P. (1995): Detection of panel-reactive anti-HLA Class I antibodies by ELISA or CDC. Results of a blinden, controlled multicenter Study. *Hum. Immunol.* 44, 1-11.
7. Cerilli, J., Bay, W., Brasile, L. (1983): The significance of the monocyte crossmatch in recipients of living-related HLA identical kidney graft. *Hum. Immunol.* 7, 45-50.
8. Cerilli, J., Brasile, L., Galouzis, T., Lempert, N., Clarke, J. (1985): The vascular endothelial cell antigen system. *Transplantation* 39, 286.
9. Christiaans, M.H.L., Nieman, F., van Hooff, J.P., Van den Berg-Loonen, E.M. (2000): Detection of HLA class I and class II antibodies by ELISA and CDC before and after the transplantation. *Transplantation* 69, 917-926.

10. Claas, F.H., Paul, L.C., van Rood, J.J. (1980): Antibodies against donor antigens on endothelial cells and monocytes in eluates of rejected kidney allografts. *Tissue Antigens* 15, 19-24.
11. Crespo, M., Lonzano, M., Oppenheimer F. (2003): Diagnosis and treatment of acute humoral rejection after kidney transplantation: Preliminary experience. *Transpl. Proc.* 35, 1677-1678.
12. Daar, A.S., Fuggle S.v., Fabre, J.W., Thing, A., Morris, P.J. (1984a.): The detailed distribution of HLA-A, B, C, antigens in normal human organs. *Transplantation* 38, 287-292.
13. Daar, A.S., Fuggle S.V., Fabre, J.W., Thing, A., Morris, P.J. (1984b.): The detailed distribution of MCH Class II antigens in normal human organs. *Transplantation* 38, 287-292.
14. Dausset, J. (1954): Leuco-agglutinins IV: leuco-antigens and blood transfusion. *Vox. Sang.* 4 , 190-198.
15. Dausset, J. (1958): Iso-leuco-anticorps. *Acta Hematol.* 20, 156-166.
16. Ettenger, R.B., Jordan, S., Fine, R.N. (1981): Autolymphocytotoxic antibodies in patients on dialysis awaiting renal transplantation. *Transplantation* 32, 248.
17. Feucht, H.E. (2003): Complement C4d in Graft Capillaries- the Missing Link in the Recognition of Humoral Alloreactivity. *Am. J. Transplant.* 3, 646.
18. Feucht, H.E., Opelz, G. (1996): The humoral immune response towards HLA class II determinants in renal transplantation. *Kidney Int.* 50, 1464.
19. Fuller A, Profaizer T, Roberts L, Fuller TC (1999): Repeat donor HLA-DR mismatches in renal transplantation is the increased failure rate caused by noncytotoxic HLA-DR alloantibodies? *Transplantation* 68, 589.
20. Gorth, J., Leverenz, S., Schönemann, C., Kaden, J., May, G., Strobell, V. (1995): Donorreaktive und panelreaktive Antikörper bei Nierentransplantatempfängern - Ursachen und Einfluss auf das Transplantatschicksal. *Transplantationsmedizin* 7, 80-86.
21. Guttman, R.D., Forbes, C. Zheng, S.X.(1997): The pathophysiology of chronic rejection. *Am. J. Med. Sci.* 313, 302-304.
22. Harmer, A.W., Haskard, D., Koffman, C.G., Welsh, K.I. (1990): Novel antibodies Associated with unexplained loss of renal allografts. *Transplant. Int.* 3, 66-69.
23. Janeway, C., Travers, P.(1997): *Immunologie*, 2 Auflage, Spektrum Verlag.

24. Jeannet, M., Lambert, P.H. (1975): Immunological studies on eluates from human kidney grafts. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 4, 478-488.
25. Joyce, S., Flye, M.W., Mohanakumar, T. (1988): Characterization of kidney cell-specific, non-major histocompatibility complex alloantigen using antibodies eluted from rejected human renal allografts. *Transplantation* 46, 362-9.
26. Joyce, S., Flye, M.W., Mohanakumar, T. (1989): Human kidney specific non-MCH antigen: Isolation and characterization using eluates from rejected renal allografts. *Transpl. Proc.* 21, 628-629.
27. Kalil, J., Guilherme, L., Neumann, J., Rosales, C., Marin, M., Saldanha, L., Chocair, P.R., Ianhez, L.E., Sabbaga, E. (1989): Humoral rejection in two HLA identical living related donor kidney transplants. *Transpl. Proc.* 21, 711-713.
28. Karuppan, S.S., Ohlmann, S., Moller, E. (1992): The occurrence of cytotoxic and non complement fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection. *Transplantation* 54, 839-844.
29. Kermann, R.H. (1991): The role of crossmatching in organ transplantation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 115, 225.
30. Kerman, R., Orosz, C.G. Lober, M.I. (1997): Clinical relevance of anti-HLA antibodies pre and post Transplantation. *Am. J. med. Sci.* 313, 275.
31. Kermann, R.H., Susskind, B., Buelow, R., Regan, J., Pouletty, P. Williams, J., Gerolami, K., Kerman, D.H., Katz, S.M., Van Buren, C.T., Kahan, B.D. Correlation of ELISA-detected IgG and IgA anti-HLA antibodies in pretransplant sera with renal allograft rejection. *Transplantation*. 1996 Jul 27;62(2):201-5.
32. Khan, N., Robson, A.J., Worthington, J.E., Martin, S (2003): The detection of IgM alloantibodies. in the presence of IgM autoantibodies using flow Koka, P., Chia, D., Terasaki, P.I., Chan, H., Chia, J., Ozawa, M., Lim, E. (1993): The role of IgA anti-HLA class I antibodies in kidney transplant survival. *Transplantation.PRA beads. Hum. Immunol.* 54, 593-599.
33. Kissmeyer-Nielsen, F. S, Petersen, V.P., Fjeldborg, O. (1969): Crossing-over within the HLA-system. *Nature* 224, 75-76.
34. Klein, J., Sato, A. (2000): The HLA System. *N. Engl. J. Med.* 343, 702-709.
35. Koka, P., Chia, D., Terasaki, P.I., Chan, H., Chia, J., Ozawa, M., Lim, E. (1993): The role of IgA anti-HLA class I antibodies in kidney transplant survival. *Transplantation.* 56, 207-211.

36. Lee, H.M., Waldrep, J.C. Mendez-Picon, G., Mohanakumar, T. (1981): Abs. eluted from rejected human renal allografts: Specificity to B lymphocytes, monocytes, primary kidney cells and endothelial cells. *Transpl. Proc.* 13, 108-110.
37. Lim, E.C., Chia, D., Gjertson, D.W., Koka, P., Terasaki, P.I. (1993): In vitro studies to explain high renal allograft survival in IgA nephropathy patients. *Transplantation.* 55, 996.
38. Lerner, R.A., Glassock, R.J., Dixon, F.J. (1967): The role of anti-glomerular basement membrane antibodies in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 126, 989-1004.
39. Lucas, Z.J., Coppon, N., Kempson, R., Cohn, R. (1970): Early renal transplant failure associated with subliminal sensitization. *Transplantation.* 10, 522-529.
40. Lucchiari, N., Panajotopoulos, N., Xu, C. Rodrigues, H., Ianhez, L.E., Kalil, J., Glotz, D. (2000): Antibodies Eluted from acutely rejected renal allografts bind to and activate human endothelial cells. *Hum. Immunol.* 61, 518-527.
41. Magee, B., Martin, J., Middleton, D. (2001): Comparison of HLA antibodies detection and characterization by CDC and ELISA. Abstract.
42. Malisan, F., Briere, F., Bridon
43. Mao, Q., Terasaki, P.I., Cai, J., El-Awar, N., Rebellato, L. (2007): Analysis of HLA Class I: specific antibodies in patients with failed allografts. *Transplantation.* 83, 54-61.
44. Martin, L., Guignier, F., Mousson, C., Rageot, D., Justrabo, E., Rifflé, G. (2003): Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 76, 395-400.
45. Martin, L., Guignier, F., Bocrie, O., D'Athis, P., Rageot, D., Rifflé, G., Justrabo, E., Mousson, C. (2005): Detection of Anti-HLA Antibodies with Flow Cytometry in Needle Core Biopsies of Renal Transplants Recipients with Chronic Allograft Nephropathy. *Transplantation* 79, 1459-1461.
46. Mauiyedi, S., Cerspo, M., Colins, A.B. Schneeberger, E.E., Pascual, M.A., Saidman, S.L., Tolkoff-Rubin, N.E., Williams, W.W., Delmonico, F.L., Cosimi, A.B., Colvin, R.B. (2002): Acute humoral rejection in kidney transplantation: Morphology, immunopathology and pathologic classification. *J.Am. Soc. Nephrol.* 13, 779-787.
47. McKenna, R.M., Takemoto, S.K., Terasaki, P.I. (2000): Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 69, 319-326.
48. Merzgar, R.S., Seigler, H.F., Ward, F.E., Rowlands, D.T. (1972): Immunological

- studies on eluates from human renal allografts. *Transplantation* 13, 131-137.
49. Miltenburg, A.M., Mejer-Paape, M.E., Weening, J.J., Daha, M.R., van Es, L.A., van der Woude, F.J. (1989): Introduction of antibody-dependent cellular cytotoxicity against endothelial cells by renal transplantation. *Transplantation* 48, 681.
 50. Mohanakumar, T., Giedlin, M.A., DuVal, C.H., Rhodes, C., Phibbs, M., Mendez, G., Kaplan, A.M., Lee, H.M. (1979): B-Lymphocyte-specific antibodies in human renal allografts. *Transpl. Proc.* 11, 397-400.
 51. Mohanakumar, T., Phibbs, M., Haar, J., Menedz, J., Kaplan, A.M., Lee, H.M. (1980): Alloantibodies eluted from rejected human renal allografts: reactivity to primary kidney cells in culture. *Transpl. Proc.* 12, 65-68.
 52. Mohanakumar, T., Waldrep, J.C., Phibbs, M., Mendez-Picon, G., Kaplan, A.M., Lee, H.M. (1981): Serological characterisation of antibodies eluted from chronically rejected human renal allografts. *Transplantation* 32, 61-66.
 53. Moraes, J.R., Stastny, P. (1977): Human endothelial cell antigens. Molecular independence from HLA and expression in blood monocytes. *Transpl. Proc.* 9, 605-607.
 54. Nani-Costa, A., Scolari, M.P., Lannelli, S., Buscaroli, A., D'Arcangelo, G.L., Brando, B., Indiveri, F., Broglino, L.C., DeSanctis, L.B. (1996): ELISA anti-HLA antibody screening identifies non-complement-fixing antibodies responsible for acute graft rejection. A case report. *Europ. J. Immunogenet.* 23, 383-387.
 55. Nunez, G., McPhaul, J., Stastny, P. (1981): Characterisation of B-cell and monocyte antibodies in recipient sera and eluates from rejected kidneys allografts. *Transplant. Proc.* 13, 111-113.
 56. Opelz, W. (1999): Factors influencing long-term graft loss. *Transpl. Proc.* 32, 647-649.
 57. Opelz, W., Wuiak, T., Back, D., Mytilineos, J., Schwarz, W., Albrecht, G. (1994): Einfluß der HLA-Kompatibilität auf die Nierentransplantation. *Infusionsther. Transfusionsmed.* 21, 198-202.
 58. Opelz, W., Wuiak, T., Döhler, B. (1999): Is HLA-matching worth the effort? *Transpl. Proc.* 31, 717-720.
 59. Parissiadis, A., Froelich, N., Tongio, M.-M. (2001): Comparison of Lambda Antigen Tray ELISA with complement cytotoxicity for detection of HLA class I and class II Abs, Abstract.
 60. Pattison, J., Krensky, A. (1997): New insights into mechanism of allograft rejection. *Am. J. Med. Sci.* 313, 257-262.

61. Payne, R., Tripp, M., Weigle, J. (1964): A new leucocyte isoantigen system in man. Cold Spring Harb. Lab. Quant. Biol. 29, 285-295.
62. Pollinger, H.S., Stegall, M.D., Gloor, J.M., Moore, S.B., Degoe, S.R., Ploeger, N.A., Park, W.D. (2007): Kidney transplantation in patients with antibodies against donor HLA Class II. Am J Transplant. 7, 857-863.
63. Ponticelli, C., Traversi, L., Feliciani, A., Cesana, B.M., Banfi, G., Tarantino, A. (2001): Kidney transplantation in patients with IgA mesangial glomerulonephritis. Kidney Int. 60, 1948.
64. Roitt, I.M. (1993): Leitfaden der Immunologie. 4. Auflage. Blackwell-Verlag.
65. Schönemann, C., Groth, J., Leverenz, S., May, G. (1998): HLA class I and II antibodies. Transplantation 11, 1519.
66. Sumitran-Karuppan, S., Tyden, G., Reinholt, F., Berg, U., Moller, E. (1997): Hyperacute rejection of two consecutive renal allografts and early loss of third transplant caused by non-HLA antibodies specific to endothelial cells. Transpl. Immunol. 5, 321-327.
67. Sapon, P., Constantino, D., Hao, P., Hahn, A., Conti, D.J., Freed, B.M. (2001): Prevalence of donor-specific anti-HLA antibodies during episodes of renal allograft rejection. Transplantation 71, 577–580.
68. Süsal, C., Kröpelin, M., Staehler, G., Groth, J., May, G., Opelz, G. (1995): Pretransplant IgA-anti-hinge and IgA-anti-Fab autoantibodies activity is associated with good kidney graft survival. Transpl. Proc. 27, 2663.
69. Süsal, C., Dohler, B., Opelz, G. (2000): Graft-protective role of high pretransplantation IgA-anti-Fab autoantibodies: confirmatory evidence obtained in more than 4000 kidney transplants. The Collaborative Transplant Study. Transplantation. 69, 1337.
70. Taylor, C.J., Chapman, J.R., Thing, A., Morris, P.J. (1989): Characterization of lymphocytotoxic antibodies causing a positive cross match in renal transplantation. Transplantation 48, 953.
71. Ten Hoor, G.M., Coopmans, M., Allebes, W.A. (1993): Specificity and class of preformed alloantibodies causing a positive crossmatch in renal transplantation. The implication for graft survival. Transplantation 56, 298.
72. Terasaki, P.I., McClelland, J.D. (1964): Microdroplet assay of human cytotoxicity. Nature 204, 889-1000.

73. Tilney, N.L., Garovoy, M.R., Busch, G.J., Strom T.B. (1979): Rejected human renal allografts: recovery and characterisation of infiltrating cells and antibodies: *Transplantation* 82, 421-426.
74. Ting, A. (1983): The lymphocytotoxic crossmatch test in clinical renal transplantation. *Transplantation* 35, 403.
75. Uboldi de Capei, M., Praticò, L., Curtoni, E. S. (2002): Comparison of different techniques for detection of anti-HLA antibodies in sera from patients awaiting kidney transplantation. *Eur. J. Immunogenet.* 29, 379, 2002.
76. Van Rood, J.J. (1962): Leucocyte grouping. Den Haag, J.H. Pasmans, 1-58.
77. v Villebrand, E., Lautenschlager, I., Krogerus, I., Hayry, P., Isoniemi, H., Salmela, K. (1996): Adhesion molecules and activation markers in acute rejection of human renal allografts. *Transpl. Immunol.* 4, 57.
78. Vögeler, U., Doxiadis I, Bucholz, B., Eigler FW, Lison, W., Niebe,l W., Zastrow, F., Grosse-Wilde, H. (1985): Cytotoxicity of antibodies eluted from rejected kidney allografts. *Transpl. Proc.* 17, 2630-2634.
79. Waßmuth, R. (1995): Einführung in das HLA System. Ecomed Verlagsgesellschaft: 1-16.
80. Worthington, J.E., Thomas, A., Dyer, P.A., Martin, S. (1998): Detection of HLA-specific antibodies by PRA-STAT and their association with transplant outcome. *Transplantation.* 65, 121-125.
81. Yard, B., Spruyt-Gerritse, M., Claas, F.H.J. Thorogood, J., Bruijn, J.A., Paape, M.E., Stein, S.Y., van Es, L.A., van Bockel, J.H., Kooymans-Coutinho, M. (1993): The clinical significance of allospecific antibodies against endothelial cells detected with an antibody-dependent cellular cytotoxicity assay for vascular rejection and graft loss after renal transplantation. *Transplantation* 55, 1287.
82. Zachary, A., Griffin, J., Lucas, D, Hart, J., Lefell, S. (1995): Evaluation of HLA antibodies with the PRA-STAT Test. *Transplantation* 60, 1600-1606.
83. Zhou, Y.C., Cecka, J.M. (1993): Effect of HLA-matching on renal transplant survival. *Clin. Tanspl.*: 499-510.

Anhang

Tabellen und Abbildungen

Tabelle 2.1 Häufigkeit der Grunderkrankung bei den Patienten (N=103)

Diagnose	Anzahl
Glomerulonephritis	46
Pyelonephritis	14
Angeborene Nierenerkrankungen	13
Diabetische Nephropathie	7
Lupus Nephritis	3
Nephrosklerose (hypertensive Nephropathie)	2
Chronische Niereninsuffizienz unklarer Genese	18

Tabelle 2.2 Zusammenfassung der Patientendaten

	Durchschnitt	
Alter des Empfängers (Jahre)	44,8 (min. 9, max. 68)	
Transplantatüberlebenszeit (Tage)	770 (min. 0, max. 4399)	
Mismatch-Rate	2,14	
Lagerungszeit der Nierenorgane (Jahre)	3,3 (min. 0, max 12.9)	
Geschlecht des Empfängers	männlich	weiblich
	58	45

Tab. 2.3 LAT-P™ Zusammensetzung des HLA-Antigenpanels

LAT-P™ Panel: Verteilung der HLA-Klasse I Antigene					
Ag	Anzahl	Ag	Anzahl	Ag	Anzahl
A1	8	B7	4	B54	2
A2	18	B8	3	B55	1
A3	2	B13	1	B56	1
A11	7	B18	4	B57	3
A23	2	B27	2	B58	2
A24	7	B35	3	B59	2
A25	2	B37	2	B60	2
A26	4	B38	2	B61	2
A29	1	B39	1	B62	3
A30	5	B41	3	B63	3
A31	3	B42	1	B64	2
A32	3	B44	4	B65	2
A33	5	B45	3	B67	1
A34	3	B46	1	B71	1
A36	2	B47	1	B72	2
A43	1	B48	1	B73	2
A66	2	B49	1	B75	1
A68	3	B50	1	B78	1
A69	2	B51	4	B81	2
A74	3	B52	2	B82	1
A80	1	B53	3		
				Cw1	8
				Cw2	7
				Cw3	2
				Cw4	8
				Cw5	1
				Cw6	8
				Cw7	18
				Cw8	6
				Cw9	2
				Cw10	1
				Cw12	1
				Cw13	1
				Cw14	1
				Cw15	1
				Cw16	1
				Cw17	3
				Cw18	1

LAT-P™ Panel: Verteilung der HLA-Klasse II Antigene					
Ag	Anzahl	Ag	Anzahl	Ag	Anzahl
DR1	5	DR12	2	DR103	1
DR4	7	DR13	5	DR51	11
DR7	5	DR14	5	DR52	19
DR8	3	DR15	7	DR53	14
DR9	4	DR16	2		
DR10	1	DR17	5		
DR11	5	DR18	1		
				DQ2	11
				DQ4	3
				DQ5	16
				DQ6	13
				DQ7	5
				DQ8	3
				DQ9	5

Legende: Ag. = HLA-Antigen; LAT™: Lambda Antigen Tray (One Lambda, Inc. USA)

Tab. 3.1 Eluate mit nachgewiesenen HLA-Klasse I Antikörpern im LCT und/ oder ELISA (LAT™, One Lambda). HLA-Klasse I Antikörperstatus im Serum (N=37)

Nr.	Pat. Nr.	E S	HLA-				%PRA LCT	%PRA ELISA	HLA-Spezifitäten im Eluat			HLA-Spezifitäten im Serum (Screening mittels LCT)			HLA-Spezifitäten im Serum mittels ELISA		TÜZ (Tage)
			A	A	B	B			nur LCT	LCT und ELISA	nur ELISA	%PRA vorTX	%PRA nachTX	Spezifität	%PRA nachTX	Spezifität nach TX	
1	23***	E	3	11	51	60	50	44	A2	A24	A25,B27,B48,B17	60		A2,A28,B41,B44			157
		S	24	-	35	60											
2	49	E	3	30	7	18	52	50		A2 ,A28		0	0				930
		S	2	25	7	18											
3	30	E	24	28	7	17	60	52	A3,A29	A1,A11 ,A26	A36,B65	70	90	A1,A11			1352
		S	1	11	5	57											
4	89**	E	2	11	35	62	70	75	A25,B27,B60,CW7	B8	A24,32,B7,	18	0				0
		S	1	11	8	62					B39,B41						
5	43	E	1	19	7	49	80	60	Bw6	A2	A9,A28	0	70	A2,A28,A68,A69	Neg.		209
		S	2	19	7	14											
6	20	E	1	3	18	35	40	48		A2	B27,B49,B40,B15	20	40	A2,B15,B17			1441
		S	2	-	51	7											
7	32	E	32	-	62	57	20	40		A24	A23,B18,B46	0	0				465
		S	24	30	13	44											
8	37	E	3	24	8	57	30	41	A1		A66, B35 ,B37,	0	5				1
		S	1	3	35	57					B56,B75						
9	88*	E	2	-	62	39	13	pos.	A30, A31		n.t.	58	0	A3,A23,A24,B35,B13			617
		S	2	31	62	38											
10	28	E	2	-	44	55	22	9	B51 ,A11		B75	70	90	A1,A11,A3,A29,B8,B57,B58,			1
		S	2	19	51	14								B35,B18,B5,B51,B52			

Nr.	Pat. Nr.	E S	HLA-				%PRA LCT	%PRA ELISA	HLA-Spezifitäten im Eluat			HLA-Spezifitäten im Serum (Screening mittels LCT)			HLA-Spezifitäten im Serum mittels ELISA		TÜZ (Tage)
			A	A	B	B			nur LCT	LCT und ELISA	nur ELISA	%PRA vorTX	%PRA nachTX	Spezifität	%PRA nachTX	Spezifität nach TX	
11	98*	E	11	31	27	44	95	100	1:4 BW6, A2		keine Spezif.	80	90	B51, B18 , B5, B35 , B8, B52, CW4	82	keine Spezifität	14
		E	2	-	35	44			1:8 B35 , B18, B62								
12	22	E	2	3	27	63	100	76	1:128 B35, B8, B18,		A2, A19, A28 ,	0	79	B35 , B8	Pos.	n.t.,	1
		S	2	28	51	62			B51 , B52, B53		B71, CW6					zu wenig Eluat	
13	65*	E	3	26	45	56	100	80	1:32 A2 , A28, B51		A1 , B27	78	100	A2 , A28, B51 , B64, B65, B52, B5			30
		S	1	2	51	-											
14	78	E	1	1	57	57	55	64		A2	A9, A28	30	50	A9, A32, A3, A11, A10, B7	Neg.		3
		S	1	28	44	-								B7, B51, B12, B50, B40			
15	91*	E	3	25	51	47	80	98		A2, A28	A26 , B27	5	0		4	A28	104
		S	3	26	7	27											
16	87	E	1	32	18	35	50	44		A2	B27 , B49	0	0		Pos.	n.t.,	1852
		S	1	3	27	62										zu wenig Eluat	
17	96*	E	2	3	13	27	4	14	A29		B62	24	16	A28, A25, A26	35	A3, A9, A10,	1
		S	2	3	7	62										B58	
18	3	E	11	19	18	27	40	50	B51, B18		A26, A28 , A33,	0	95	A1, A2, A28 , A23, A24, B44, B45	Neg.		1
		S	1	28	44	61					CW2, B35						
19	81	E	2	3	27	35	20	25		B7	B27, B54	0	0				1
		S	2	24	-	35											
20	95	E	2	24	7	44	30	20	1:2 A31	B7		0	0		0		1
		S	2	24	7	44											
21	14*	E	1	2	61	75	35	71	B7	B27	A2, A33, A28,	31	0	B35, B5	0		834
		S	-	2	62	-					CW1						

Nr.	Pat. Nr.	E S	HLA-				%PRA LCT	%PRA ELISA	HLA-Spezifitäten im Eluat			HLA-Spezifitäten im Serum (Screening mittels LCT)			HLA-Spezifitäten im Serum mittels ELISA		TÜZ (Tage)
			A	A	B	B			nur LCT	LCT und ELISA	nur ELISA	%PRA vorTX	%PRA nachTX	Spezifität	%PRA nachTX	Spezifität nach TX	
22	57*	E	1	2	18	35	2	46		A11	A9,A2,A3	66	55	A9,A10,A32,A29,	Pos.	n.t.,	2555
		S	1	26	8	60								B44,B57,B58,B27		zu wenig Eluat	
23	55*	E	3	24	35	-	92	75	1:64 A2	B7,B27	CW1	10	95	A1,A2,A28,A26	Neg.		1185
		S	3	24	35	-								B60,B61,B7,B27,B22,			
24	69*	E	2	11	7	51	4	40	A2	A9	A33,B7,B48,B56	30	80	A9,A19,B12,B40	53	A2, A3, A24,	120
		S	2	-	7	51										CW9	
25	52	E	2	3	35	62	5	48	B13		B27,B53,B58,	60	60	A32,A23A24,A25,A26,A1			1
		S	2	3	35	-					Cw7						
26	10	E	11	25	18	51	45	32	A2		A3,A9	60	75	A2,A9			0
		S	11	29	35	52											
27	42	E	3	-	7	35	0(1:1)	0	1:4 <u>A32</u>			18	0	A9			2810
		S	3	<u>32</u>	7	12	6(1:4)										
28	17	E	1	24	35	56	0(1:1)	0	1:4 A32, <u>A25</u>			0	0		Neg.		270
		S	23	<u>25</u>	44	35	10(1:4)										
29	77	E	2	-	13	60	10	0	1:1 B37, 1:2 A32			92	0	B7, B27	Neg.		3466
		S	2	-	44	60											
30	101	E	3	29	7	62	100 (1:1)	0	1:32			0	0		44	A2, A3, A11, A24	30
		S	3	-	7	-	55(1:32)		A28,A1,B57,B58								
31	85**	E	9	10	44	18	0	23			<u>A1</u> ,A33	0	80	A1,A11,A3,B57,B58	Neg.		2600
		S	<u>1</u>	11	57	61											
32	47	E	1	24	51	61	0	41			<u>A2,A29</u>	0	70	A2,A29			2800
		S	<u>2</u>	<u>29</u>	51	-											

Nr.	Pat. Nr.	E S	HLA-				%PRA LCT	%PRA ELISA	HLA-Spezifitäten im Eluat			HLA-Spezifitäten im Serum (Screening mittels LCT)			HLA-Spezifitäten im Serum mittels ELISA		TÜZ (Tage)
			A	A	B	B			nur LCT	LCT und ELISA	nur ELISA	%PRA vorTX	%PRA nachTX	Spezifität	%PRA nachTX	Spezifität nach TX	
33	75	E	1	28	8	60	0	43			<u>A2</u> ,A3,B72	30	30	B5,B17	Neg.		2353
		S	1	<u>2</u>	8	60											
34	44	E	2	24	62	35	0	76			<u>A3</u> ,A32,A34,A66,	40	70	B57,B58,B51,B52			1771
		S	<u>3</u>	<u>28</u>	-	51					<u>A28</u> ,CW1,CW8						
35	102	E	1	2	45	13	0	2			B57	0	0		Neg.		1540
		S	2	3	7	44											
36	61	E	2	11	44	51	0	30			A3,A33	0	0				2500
		S	2	11	-	51											
37	84*	E	2	-	44	18	0	66			A3,A9,A11	0	33		Neg.		1
		S	2	-	18	-											13565

Legende:

E = Empfänger, S = Spender, PRA = Panelreaktivität, LCT = Lymphozytotoxizitätstest, TÜZ = Transplantatüberlebenszeit.

Hervorgehoben wurden die donorspezifischen Eluat-Antikörper (fett, unterstrichen) und die Antikörper-Spezifitäten die sowohl im Eluat als auch im Serum vor bzw. nach Transplantation nachweisbar waren (fett).

Patienten mit Vortransplantationen wurden mit Stern markiert (*), die Anzahl der Sterne entspricht der Anzahl der Vortransplantationen.

Tab.3.2 Eluate mit nachgewiesenen HLA-Klasse II Antikörper im ELISA (LAT™, One Lambda und/oder B-Screen™ Immunoassay, GTI) (N=39)

Nr.	Pat. Nr.	E S	HLA-				HLA-Spezifitäten im Eluat mittels ELISA (LAT)		Eluat im B- Screen™	HLA-Spezifitäten im Serum mittels ELISA (LAT)		TÜZ (Tage)
			DR	DR	DQ	DQ	%PRA	Spezifität		%PRA	Spezifität nach TX	
1	37	E	3	7	2	3	62	<u>DR1,DQ5</u> ,DQ7	pos			1
		S	<u>1</u>	7	<u>5</u>	-						
1	30	E	1	-	1	-	56	<u>DR7</u> ,DQ4,	pos			1352
		S	1	<u>7</u>	1	3						
3	53	E	11	-	3	-	63	<u>DR7</u> ,DR52,DR15	pos			1
		S	<u>7</u>	11								
4	90	E	13	7	1	2	43	DR17,DR18, <u>DQ7</u>	pos	pos	n.t.	1355
		S	13	7	<u>7</u>	9						
5	58	E	4	8	3	-	12	DQ6	pos			1
		S	6	8								
6	57	E	13	14	5	6	68	DR51,DR11,DQ5	pos	pos	n.t.	2555
		S	13	17								
7	98*	E	4	-	3	-	87	DR52,DQ4,DQ7	pos	56	DR52	14
		S	4	-								
8	9	E	1	-	1	-	52	DR52	pos			1051
		S	1	2	1	-						
9	10	E	2	3	2	6	53	DR52	pos			0
		S	3	-								
10	14*	E	1	14	3	5	81	DR51,DR52,DR8	pos	75	DR52, DR9,DQ4	834
		S	3	13	1	3						
11	15	E	5	6			59	DQ2,DQ12	pos	0		841
		S	13	-								
12	16	E	4	5	3	-	21	DR4	pos	0		0
		S	4	5								
13	23***	E	11	13	1	3	12	DR12,DR53,DQ6	pos			157
		S	11	13								
14	28	E	11	6	1	2	6	DR10	pos			1
		S	3	9								
15	43	E	10	13	5	6	50	DR11,DR51,DQ7	pos	0		209
		S	6	-	1	6						
16	52	E	4	-	3	-	25	DR11	pos			1
		S	1	8								
17	65*	E	1	4	1	3	28	DR17	pos			30
		S	4	-	3	8						

Nr.	Pat. Nr.	E S	HLA-				HLA-Spezifitäten im Eluat mittels ELISA (LAT)		Eluat im B- Screen™	HLA-Spezifitäten im Serum mittels ELISA (LAT)		TÜZ (Tage)
			DR	DR	DQ	DQ	%PRA	Spezifität		%PRA	Spezifität Nach TX	
18	78	E	4	7	2	3	71	DR51	pos	0		3
		S	4	13								
19	89**	E	1	4	1	3	31	DQ2	pos			0
		S	1	4	1	3						
20	91*	E	5	7	2	3	93	DQ4,DQ5,DQ6	pos	10	DR8	104
		S	2	5								
21	21*	E	7	13	1	2	46	DQ2	neg			1900
		S	4	6								
22	39	E	7	6	1	2	59	DR11,DQ2,DQ4	neg	pos	n.t.	0
		S	7	8								
23	44	E	13	9	1	3	9	DR103	neg			1771
		S	13	9	1	3						
24	47	E	2	6	5	6	12	DR13	neg			2800
		S	-	6	1	-						
25	61	E	4	7	2	3	40	DR52	neg			2500
		S	4	-	3	-						
26	85**	E	2	7	1	2	22	keine	neg	0		2600
		S	2	7	1	2						
27	84*	E	3	4	2	3	84	keine	pos	0		1
		S	3	5	1	3						
28	69*	E	4	15	3	6	96	keine	pos	43	DQ6, DQ7	120
		S	4	15	-	-						
29	75	E	2	3	1	2	84	keine	pos	pos	n.t.	2353
		S	2	3	-	-						
30	102	E	4	7	2	3	34	keine	pos	0		1540
		S	1	7	1	-						
31	48	E	3	8	2	-	pos	keine	pos			676
		S	2	3	1	2						
32	50	E	3	11	2	3	pos	keine	pos			1270
		S	3	9	2	3						
33	7	E	4	6	1	3	neg		pos			38
		S	4	6								
34	20	E	1	4	1	3	neg		pos			1441
		S	1	4	1	3						

Nr.	Pat. Nr.	E S	HLA-				HLA-Spezifitäten im Eluat mittels ELISA (LAT)		Eluat im B- Screen™	HLA-Spezifitäten im Serum mittels ELISA (LAT)		TÜZ (Tage)
			DR	DR	DQ	DQ	%PRA	Spezifität		%PRA	Spezifität nach TX	
35	22	E	4	11	3	-	neg		pos			1
		S	2	12								
36	26	E	4	6	1	3	neg		pos			1
		S	4	6	1	3						
37	32	E	5	9	3	-	neg		pos			465
		S	9	11								
38	70	E	9	11	3	-	neg		pos			3606
		S	4	5								
39	92	E	11	12	3	-	neg		pos	68	DR53, DQ5	20
		S	11	-								

Legende:

E = Empfänger, S = Spender, PRA = Panelreaktivität, LCT = Lymphozytotoxizitätstest, TÜZ = Transplantatüberlebenszeit.

Hervorgehoben wurden die donorspezifischen Eluat-Antikörper (fett, unterstrichen) und die Antikörper-Spezifitäten die sowohl im Eluat als auch im Serum vor bzw. nach Transplantation nachweisbar waren (fett).

Patienten mit Vortransplantationen wurden mit Stern markiert (*), die Anzahl der Sterne entspricht der Anzahl der Vortransplantationen.

Tab. 3.3 Proteinkonzentration und IgG, IgA, IgM -Konzentration in den Niereneluaten

Nr.	Prot. mg/ml	Ig G	Ig A	IgM
1	6624	112	23.39	8.9
2	927	15.4	3	2
3	1330	11	2	1
4	932.8	32	6	36
5	937.7	7		
6	1013	7	3	1
7	1234	33	3	8
8	498.4	6.01	0	2
9	296.9	40	9	2
10	282.4	6.01	0	0
11	1542	15	7.8	3.2
12	2491	12	5	2
13	760.2	3	0	0
14	4709	210	8	6
15	2093	53	2	3
16	1416	4	2	1
17	1211	20	10	0
18	1292	9	3	2
19	2424	9	2	1
20	3192	92.1	9.24	0.83
21	1281	n.t.	n.t.	n.t.
22	4166	4.8	1	0
23	1545	27	2	2.8
24	2520	17	2	0
25	181	17	0	6
26	2000	40	12	0.6
27	1519	35.2	5	
28	1136	6	1	1.7
29	889.9	10	1.5	1.2
30	2328	72.5	10	2.87
31	2843	8	5	0
32	8728	145	2	2
33	2704	153	14.5	3.7
34	1981	2	0.7	0.8

Nr.	Prot. mg/ml	Ig G	Ig A	IgM
35	296.9	4	0	0
36	557.5	n.t.	n.t.	n.t.
37	1280	41	5.8	0.7
38	1451	34	5	0
39	981.2	12	2	
40	4657	101	30	0.2
41	1652	8	1.4	
42	1692	6	2.5	0.5
43	4911	175	17	8
44	2866	26	12	
45	3039	23	7	5
46	1878	25	17	0
47	2872	12	5.4	3.8
48	1277	11.98	4.1	2.05
49	5596	210	8	3.7
50	1629	5	1	1
51	855.2	61	22	8.3
52	1068	6	1.3	1.9
53	1519	76	25	14
54	1210			
55	2584	23	2	2.1
56	450	7	0	0
57	4733	3.36	6.33	2.3
58	624	23	3	1.5
59	528	3		13
60	1600	72	32	24
61	1496	33	8	6
62	1077	10	3	3
63	90.7	33	20	0
64	1416	16	2.5	2
65	197	79	15	11
66	4281	5	1	0
67	2689	0		
68	3781	85	2.4	3.1

Nr.	Prot. mg/ml	Ig G	Ig A	IgM
69	3085	75	18	0
70	195	15	0	0
71	2484	48	5	2
72	872.4	4	2	2
73	644	2	2	0
74	2834	88.54	18.34	3.52
75	338	3.8	4	
76	1157	5	5	1
77	1175	53	4	2
78	3458	16	8	2
79	1366	10	5	2
80	1859	6	1	1
81	1030	15	18	2
82	722	4	0	0
83	869	28.17	2.43	1.05
84	2915	30	11	2
85	656	5	1.9	0
86	3968	13	2	1
87	2964	18	1	1
88	2199	6	1	1
89	647	9	0	1.5
90	918	48	10	7
91	1846	30	8	0
92	551	15	8	0
93	2441	80	6	4.5
94	887	3	0	0
95	111.3	252	120	15
96	1141	28	17	24
97	1470	5	2	1
98	546	0	0	0
99	1222	4	0	
100	2511	51	5.1	0
101	1141	52	10	1.7
102	2349	4	3	1
103	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

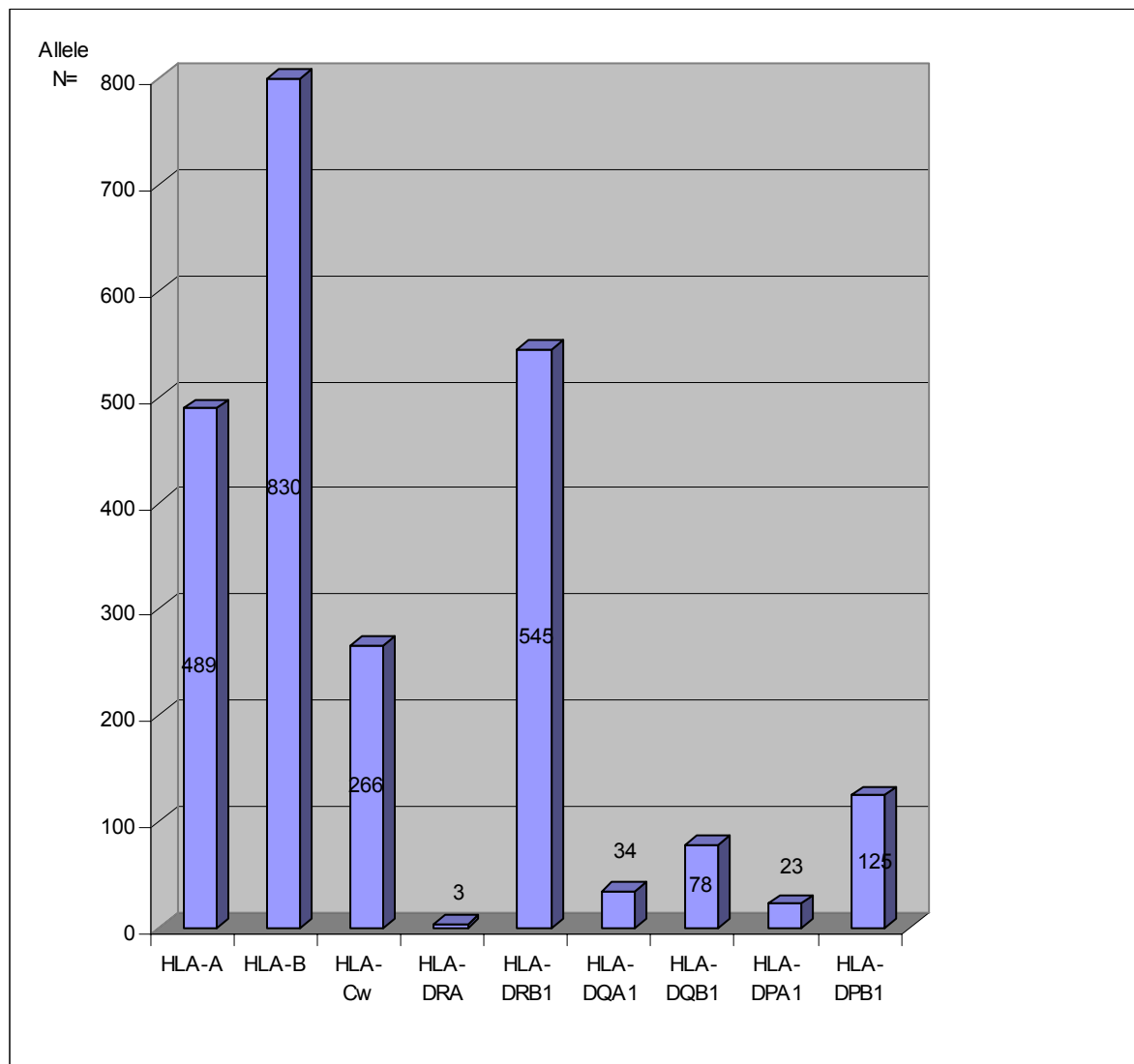
Tab. 3.4 Mittelwerte der IgG, IgA und IgM-Konzentrationen in den Niereneluaten nach hyperakuten (n=33), akuten (n=19) und chronischen (n=51) Abstoßungsreaktionen.

Abstoßung	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	TÜZ (Tage)	n
Hyperakut	30,24	8,54	2,09	<3	33
Akut	27,57	6,22	5,27	3 - 90	19
Chronisch	30,84	5,76	2,47	>90	51

TÜZ= Transplantatüberlebenszeit

8. Abbildungen

Abb.1.1 Polymorphismus der HLA-Allele (Stand Dezember 2006, Datenquelle: The International Immunogenetics / HLA Sequence Database)



Dargestellt sind die Anzahl der bekannten HLA-Allele auf höchstem molekulargenetischen Auflösungsgrad für die genannten Genorte.

Abb. 1.2 Struktur und Funktion der HLA-Klasse I und -II Moleküle (nach Waßmuth, 1995)



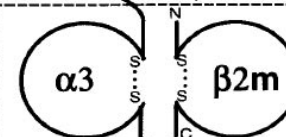
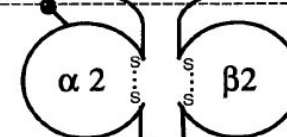
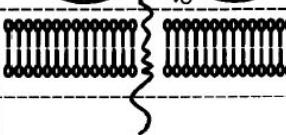
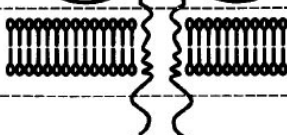
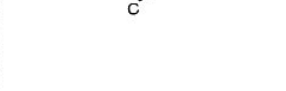
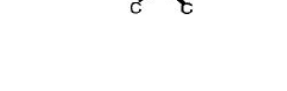
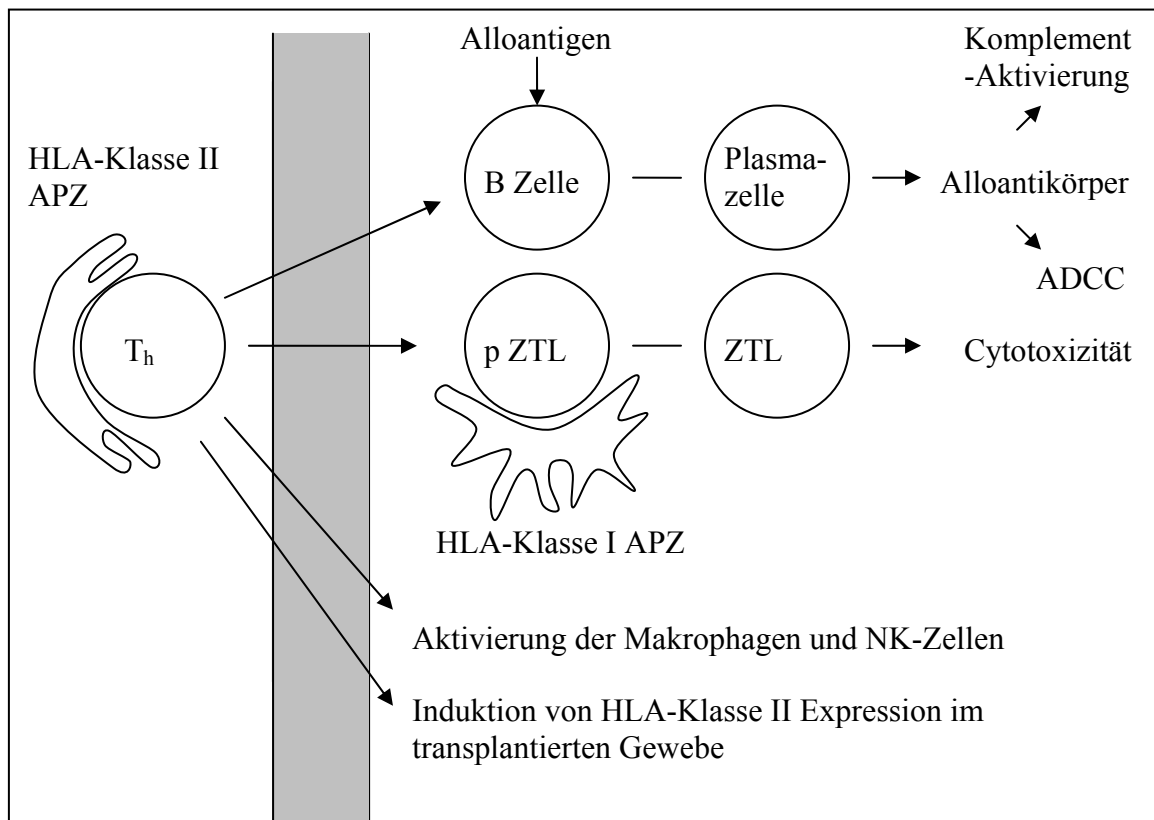
Region	Struktur		Funktion
	Klasse I	Klasse II	
Peptid-Bindungs-region			Antigen-präsentation
Immunoglobulin-ähnliche Region			Struktur-stabilisierung, CD4/CD8 Bindung
Trans-membran-Region			Verankerung
Zytoplasmatische Region			Signaltrans- duktion?

Abb. 1.3 Mechanismen der Transplantatabstoßung (nach Krensky, 1997)



Legende:

APZ= antigenpräsentierende Zelle, T_h= T Helfer Zelle, pZTL= Vorläufer eines zytotoxischen T- Lymphozyten, ZTL= zytotoxischer T-Lymphozyt, NK= Natürliche Killerzelle, ADCC= antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Abb.2.1 Anzahl der Transplantationen und Alter der Empfänger

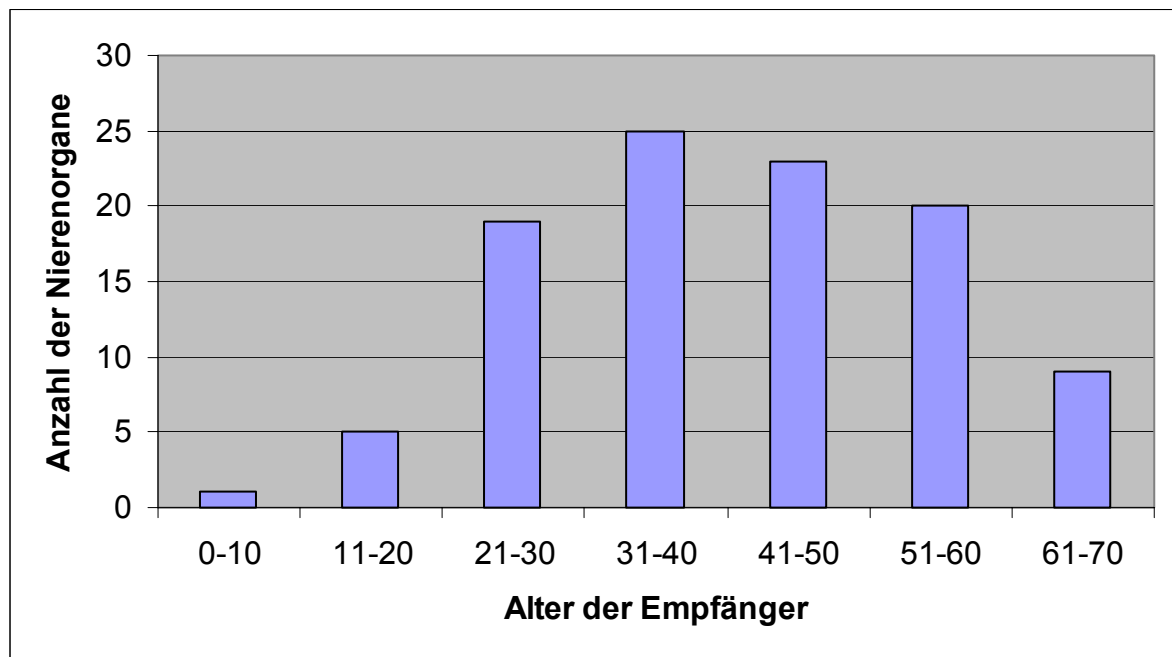
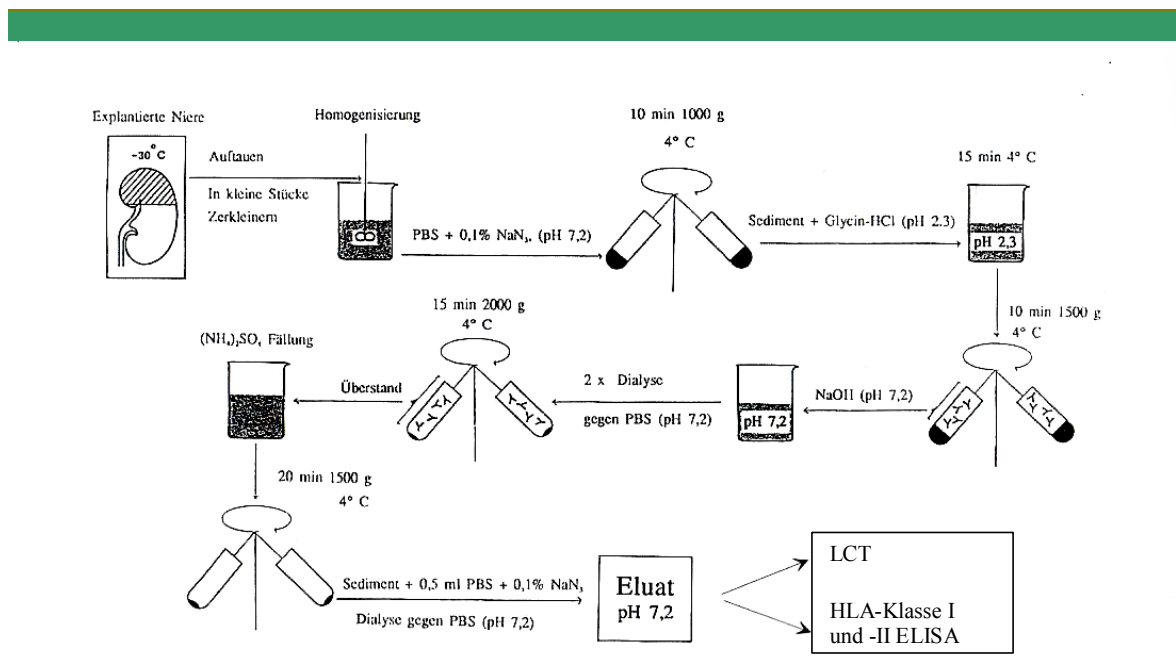


Abb. 2.2. Explantataufarbeitung, Herstellung der Niereneluat



Legende: PBS = Phosphate buffered saline, LCT = Lymphozytotoxizitätstest, ELISA = Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay

Abb. 3.1 Nachweis von HLA-Klasse I Antikörpern in 103 Niereneluaten mittels LCT

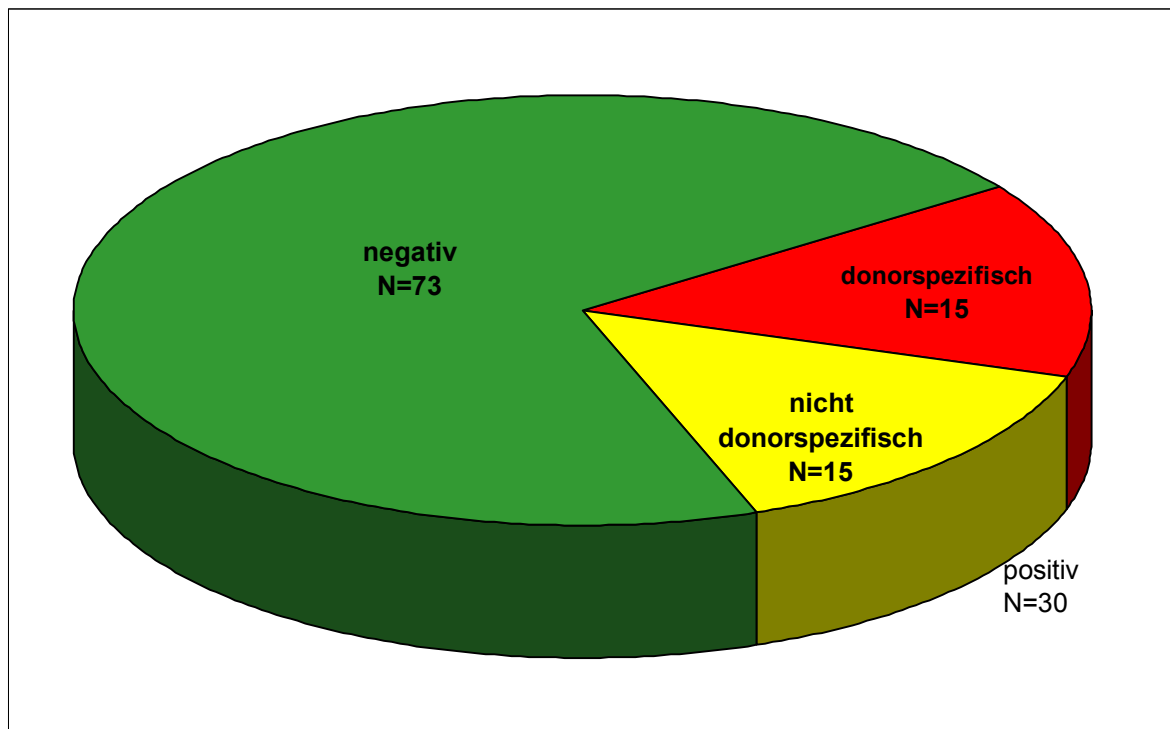


Abb. 3.2 Nachweis von HLA-Klasse I Antikörpern in 103 Niereneluaten mittels ELISA (LAT-M™ / LAT-P™, One Lambda)

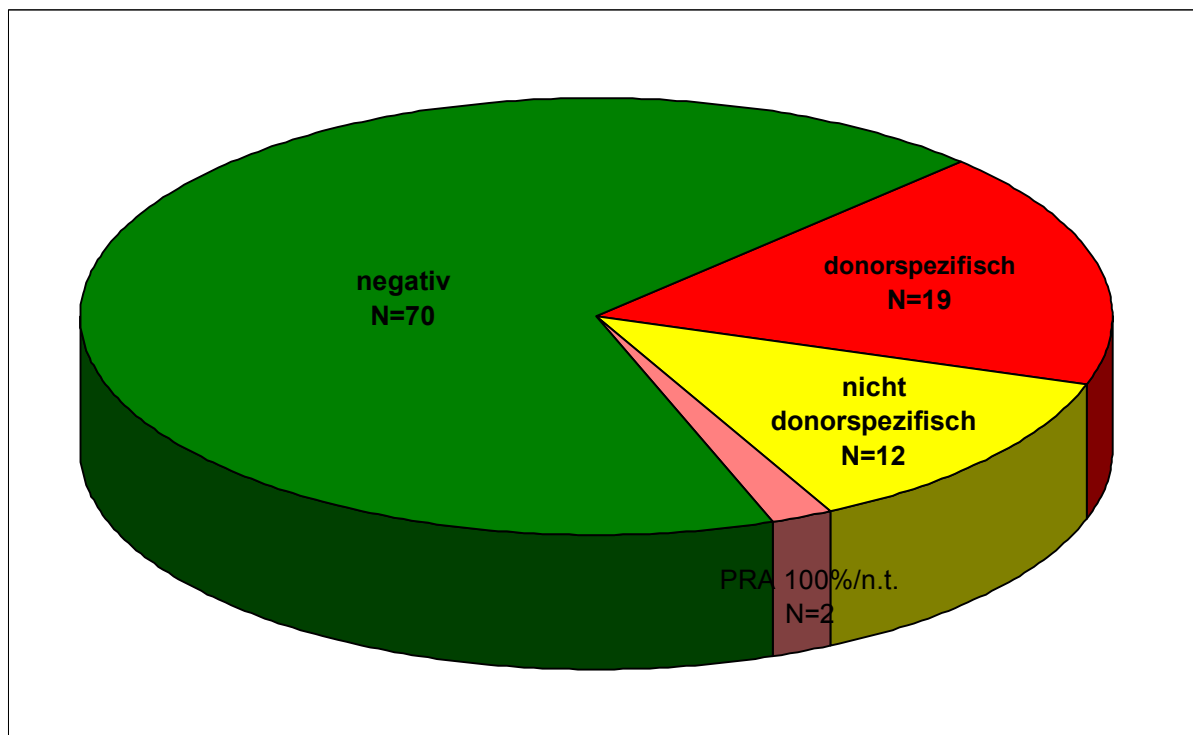


Abb. 3.3 HLA-Klasse I Antikörperstatus der untersuchten Niereneluataten (N=103):
Vergleich zwischen LCT und ELISA.

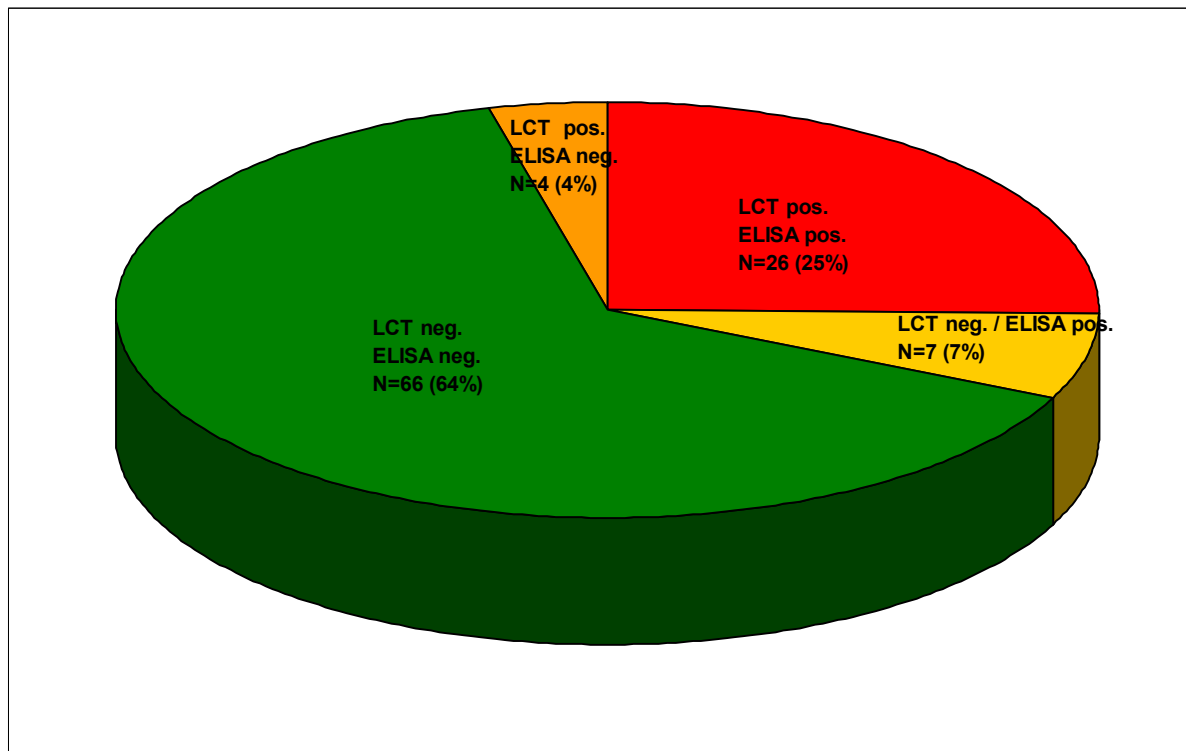


Abb. 3.4 Korrelation der Panelreaktivitäten (% PRA) im LCT und ELISA)

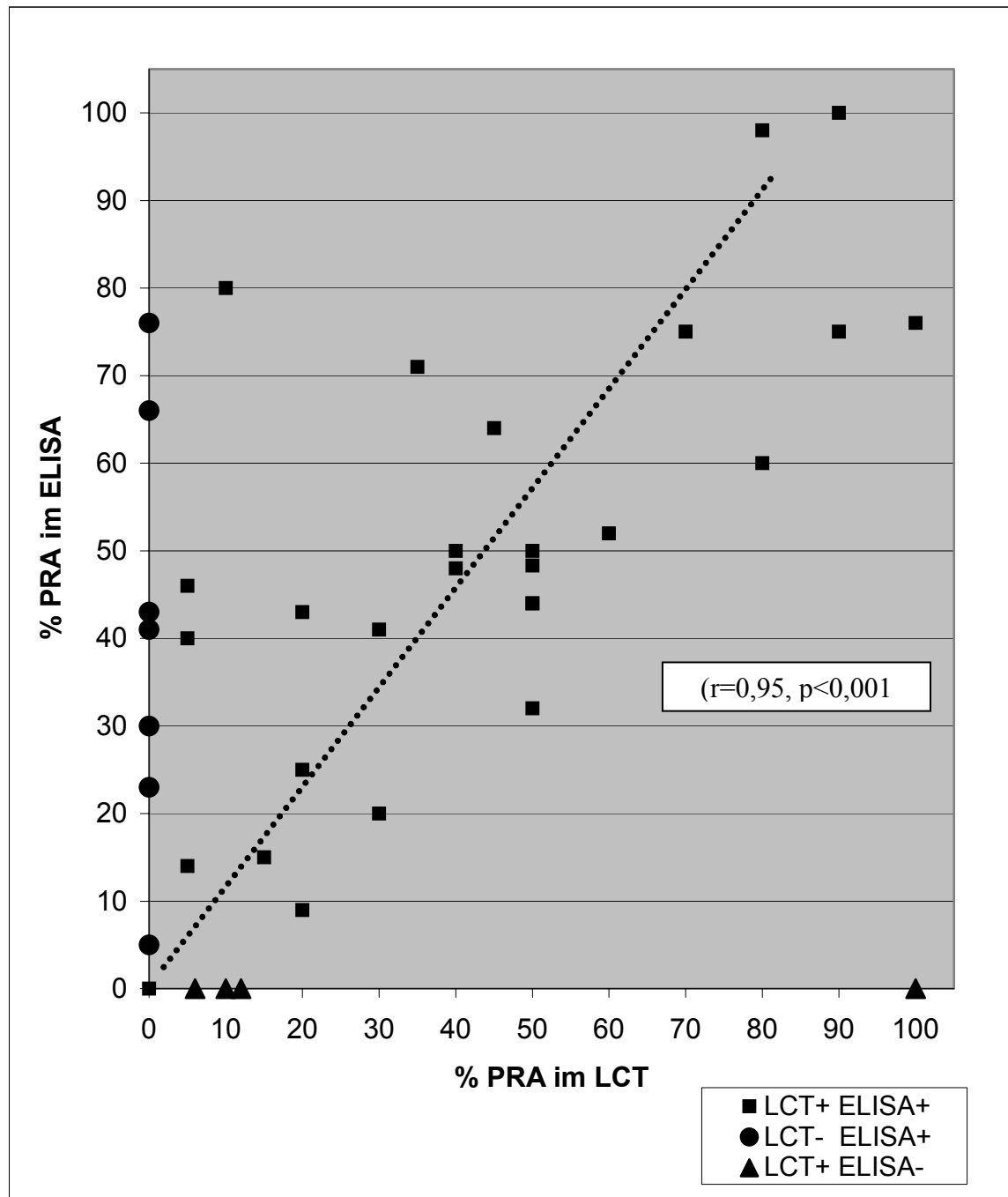


Abb. 3.5 HLA-Klasse II Antikörperstatus der im ELISA untersuchten Niereneluat (LAT™, One Lambda, B-Screen™ Immunoassay, GTI).

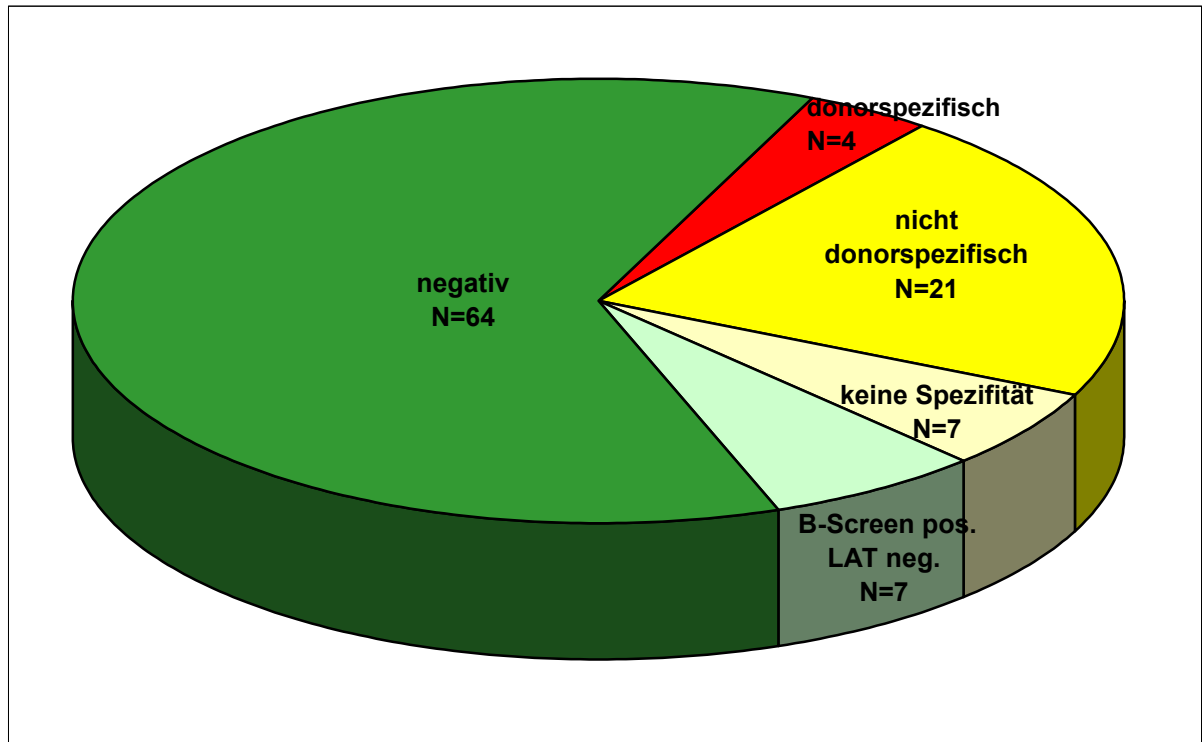
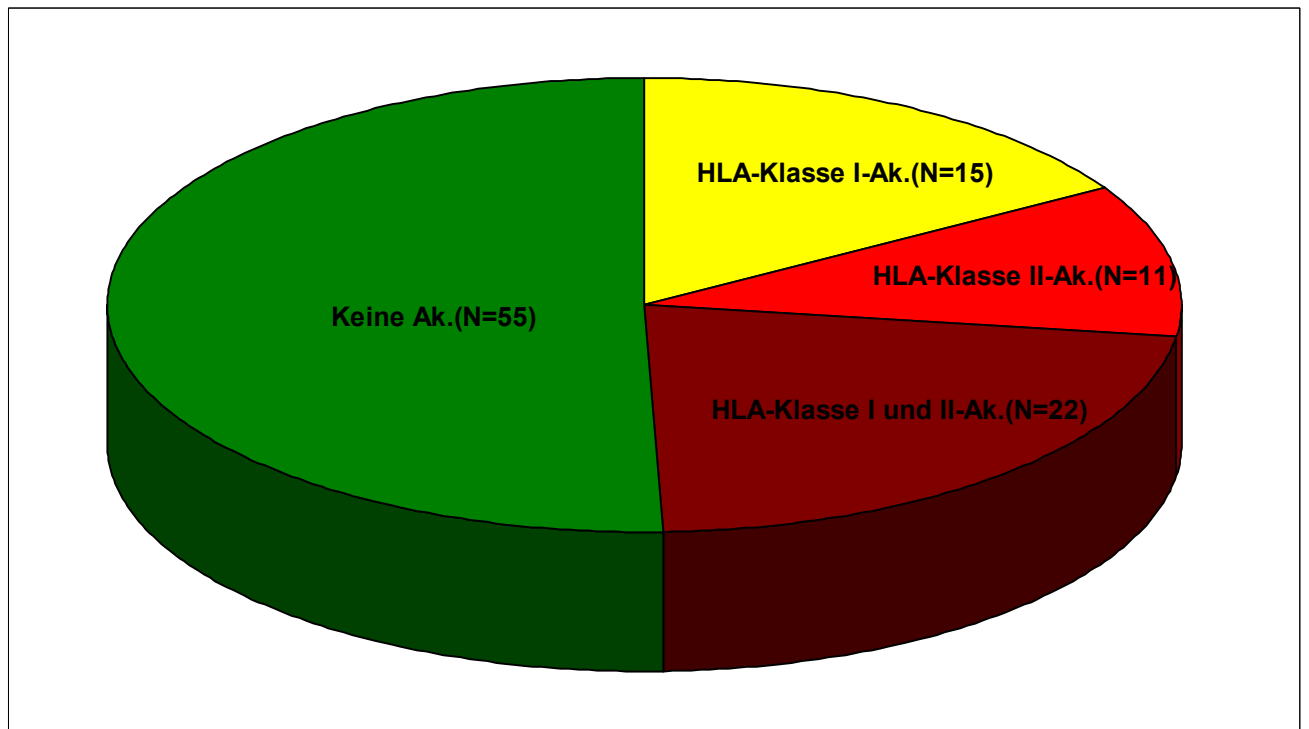


Abb. 3.6 HLA-Klasse I und II Antikörper Antikörperstatus der LCT und ELISA untersuchten Niereneluat (LAT™, One Lambda)



Legende: Ak = Antikörper

Abb. 3.7 Transplantatüberleben und HLA-Antikörper-Status der Niereneluat

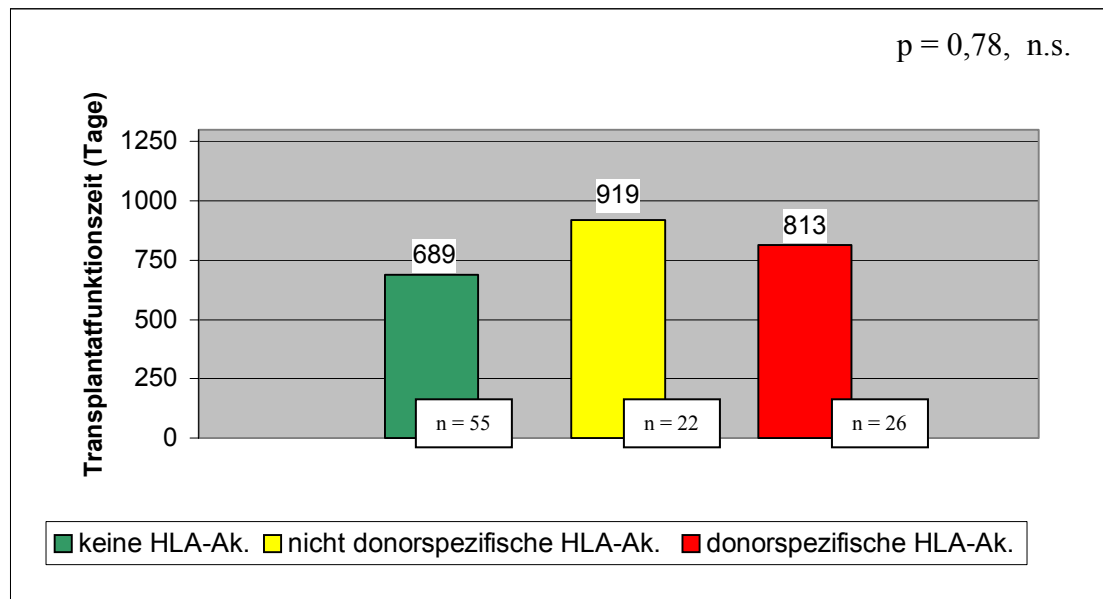


Abb. 3.8 Transplantatüberleben und HLA-Klasse I und -Klasse II Antikörper-Status der Niereneluat im LCT und ELISA

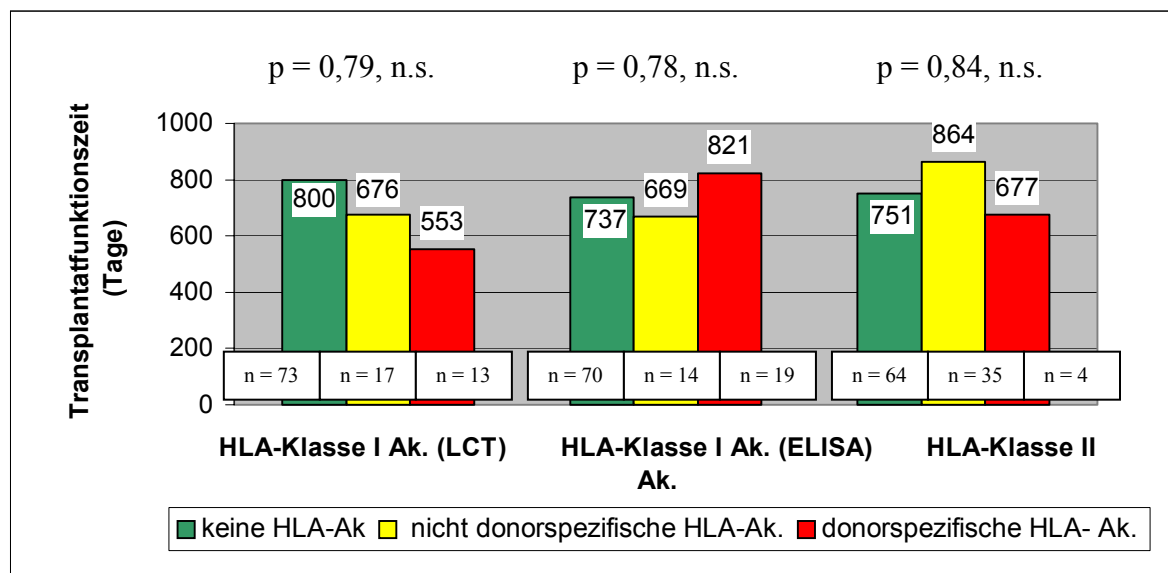


Abb. 3.9 Transplantatüberleben und HLA-Antikörper-Status der Nierenukte

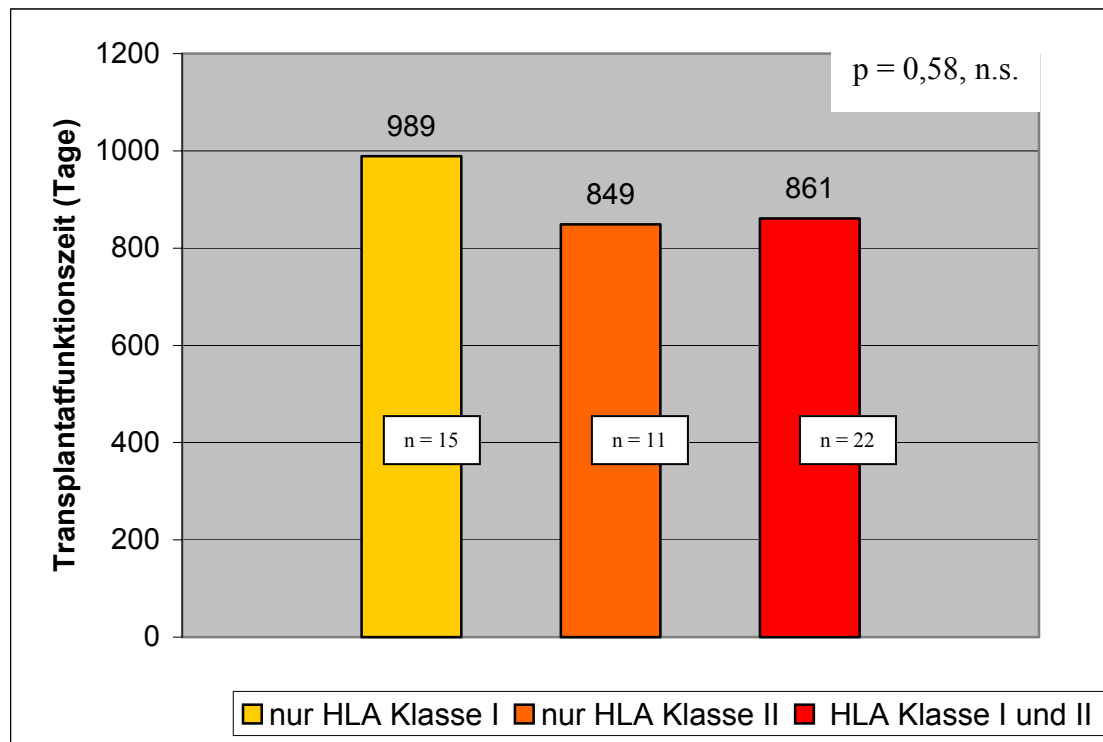
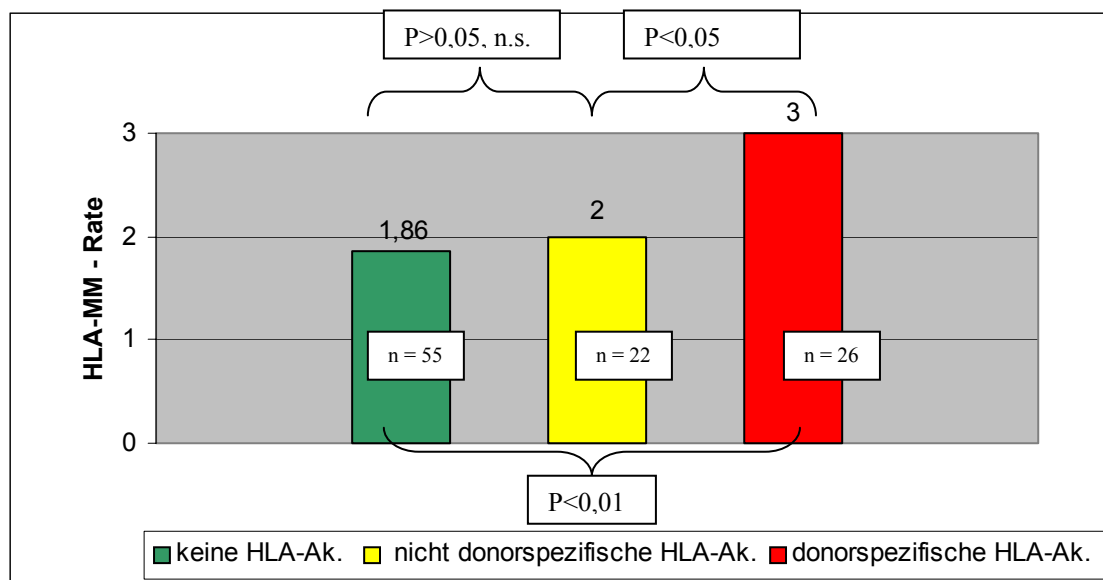


Abb. 3.10 HLA-Mismatch-Rate und HLA-Antikörper-Status der Nierenukte



Legende: MM = Mismatch

Abb. 3.11 HLA-Mismatch-Rate und HLA-Klasse I und Klasse II Antikörper-Status der Niereneluatate (LCT und ELISA)

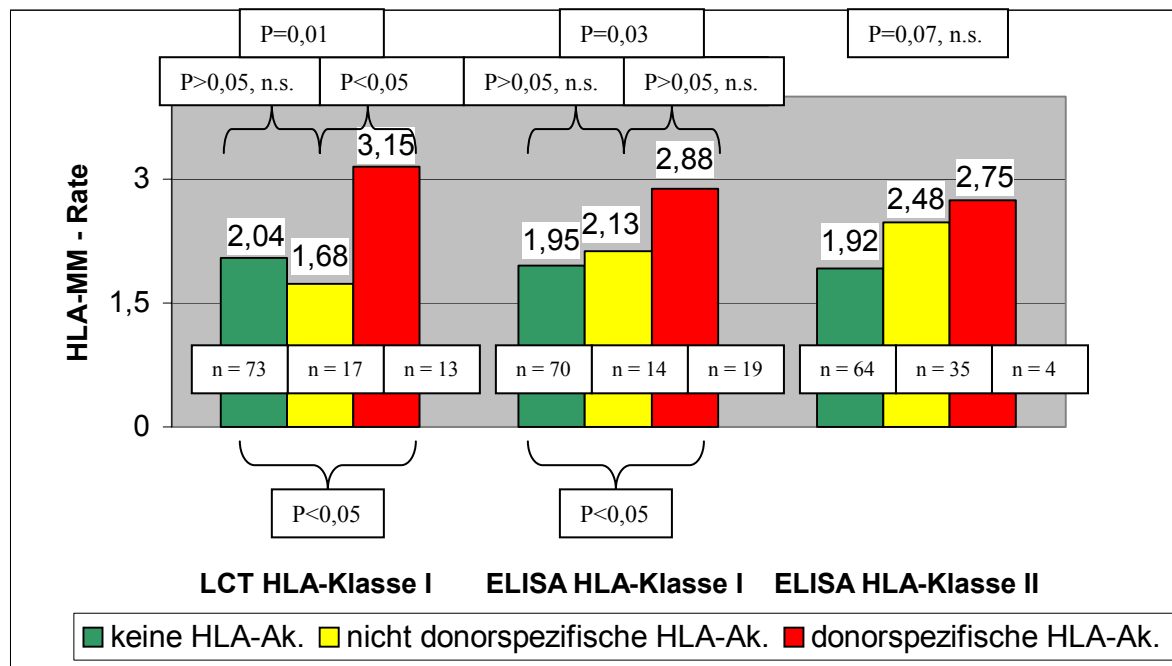
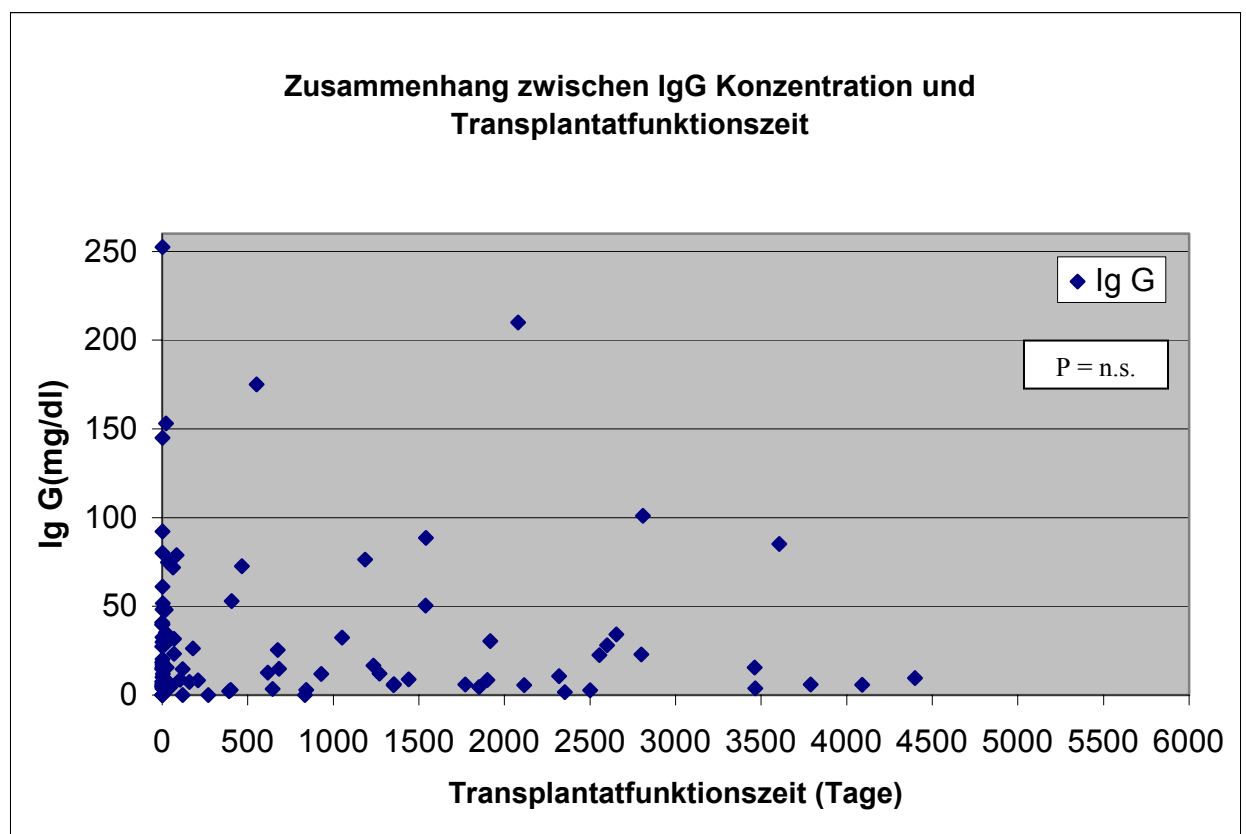
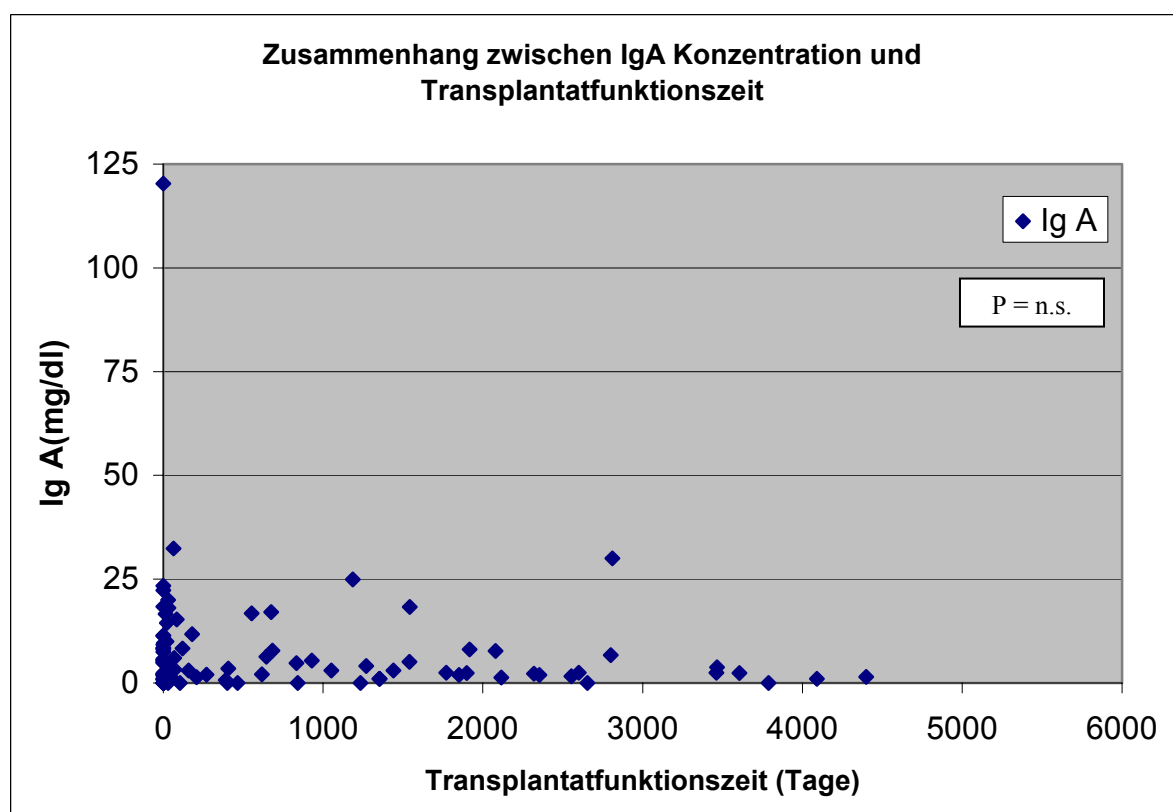
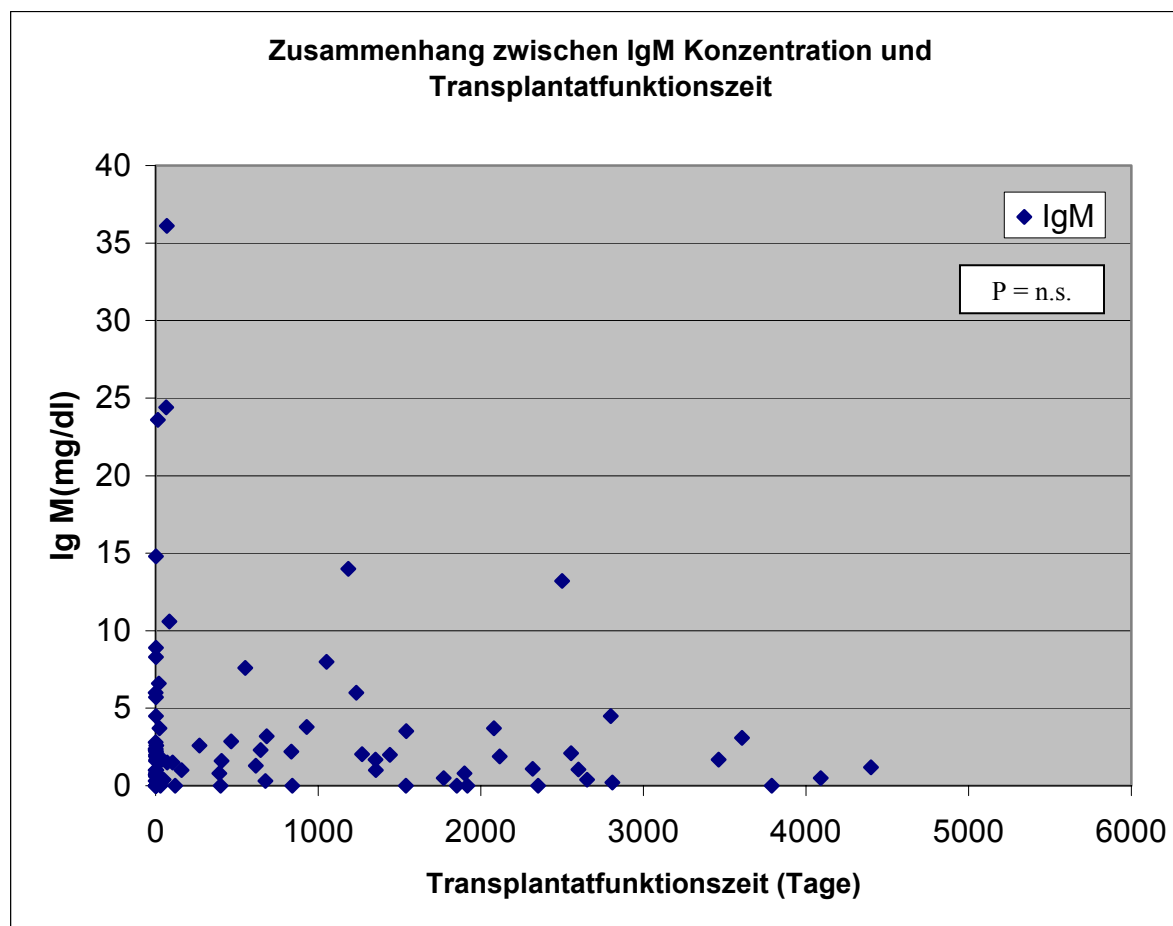


Abb.3.12 Zusammenhang zwischen IgG, IgM und IgA Konzentration und Transplantatfunktionsrate der Niereneluatate





Verzeichnis der Abkürzungen

ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
APZ	Antigen präsentierende Zelle
DTT	Dithiothreitol
E	Empfänger
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HLA	Human leukocyte antigen
Ig	Immunglobulin
LAT TM	Lambda Antigen Tray
LCT	Lymphozytotoxizitätstest
MM	Mismatch
n.t.	nicht getestet
NIH	National Institute of Health
NK	Natürliche Killerzelle
n.s.	nicht signifikant
PBS	Phosphate buffered saline
PRA	Panelreaktivität
pZTL	Vorläufer eines zytotoxischen T- Lymphozyten
r	r-Wert
S	Spender
T _h	T Helfer Zelle
TÜZ	Transplantatüberlebenszeit
ZTL	zytotoxischer T-Lymphozyt

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde, Direktor des Institutes für Immunologie Universitätsklinikum Essen, danke ich für die Überlassung dieses Themas, für die Unterstützung dieser Arbeit und für die Bereitstellung der erforderlichen materiellen Voraussetzungen.

Herrn Dr. rer. nat. F. Heinemann und Frau Priv.-Doz. Dr. rer. medic. V. Rebmann danke ich herzlich für die ausdauernde Unterstützung bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit, sowie bei der Erstellung der Disserationsschrift.

Bedanken möchte ich mich insbesondere bei meinem Ehemann und bei meinen Eltern, die mich vielseitig bei meiner Arbeit unterstützten.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name **Ioana Roth, geb. Heretiu**

Wohnort: Stuttgart

Geburtsdatum 01.10.1973

Geburtsort: Arad, Rumänien

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schule

1984-1992 „Moise Nicoara“ Gymnasium Arad, Rumänien

07/1992 Abitur

Studium

09/1992-07/1995 Studium der Humanmedizin an der Universität Timisoara, Rumänien

09/1995-7/2000 Studium der Humanmedizin an der Universität Essen

Berufserfahrung

07/2000-12/2005 Assistenzärztin für Innere Medizin, Enzkreiskliniken Mühlacker

10/2003 Fachkunde Rettungsdienst / Notfallmedizin

02/2005 bis heute Assistenzärztin für Innere Medizin, Bürgerhospital, Klinikum Stuttgart, Schwerpunkt Diabetologie, internistische Intensivmedizin.



journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm



Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts

Falko M. Heinemann^a, Ioana Roth^a, Vera Rebmann^a, Marie-Luise Arnold^b, Oliver Witzke^c, Benjamin Wilde^c, Bernd M. Spriewald^b, and Hans Grosse-Wilde^{a,*}

^a Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Essen, Essen, Germany

^b Medizinische Klinik 3, Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen, Germany

^c Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg, Essen, Germany

Received 23 August 2006; received in revised form 22 January 2007; accepted 21 February 2007

KEYWORDS

Kidney
transplantation;
Anti-HLA antibodies;
Non-complement-
binding antibodies;
Acid protein elution

Summary To evaluate the immunoglobulin isotypes of anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies harbored in rejected renal allografts, we isolated proteins by acid elution accumulated in 94 rejected and explanted kidneys and characterized their antibody specificities by complement-dependent cytotoxicity, enzyme-linked immunosorbent assay, and flow cytometry (Luminex) techniques. In addition, we differentially analyzed non-complement-binding immunoglobulin (Ig) G2/4 and IgA1/2 antibodies in the eluates using two modified solid phase assays. We found non-complement-binding IgG2 and IgG4 antibodies in 16/58 (28%) of the IgGall-positive eluates, 15 eluates with anti-HLA class I and 4 with anti-HLA class II specificities, respectively. Anti-HLA class I IgG2/4 antibodies directed against the donor were found in 7 eluates (54% of the IgG2/4-pos. eluates), whereas 2 eluates (50%) had class II IgG2/4 antibodies directed against the donor. IgA1/2 antibodies could be detected in 9 eluates (16%); 5 of them had anti-HLA class I and 5 anti-HLA class II antibodies. We could clearly exhibit that explanted kidney allografts harbor anti-HLA antibodies. Moreover, our study demonstrates that non-complement-binding anti-HLA antibodies accumulate in rejected renal allografts.

© 2007 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Despite the availability of potent immunosuppressive therapies, the presence of preformed anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies in recipient serum prior to renal transplantation is still recognized as a prominent risk factor

* Corresponding author. Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Essen, Virchowstrasse 171, D-45147 Essen, Germany.
E-mail address: immunologie@uk-essen.de (H. Grosse-Wilde).

ABBREVIATIONS

CDC	complement-dependent cytotoxicity
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HLA	human leukocyte antigen
Ig	immunoglobulin
LAT	λ antigen tray
PRA	panel reactive antibodies

for irreversible allograft rejection. This was demonstrated first nearly 30 years ago and resulted in the introduction of the crossmatch test prior to kidney transplantation [1,2]. Later studies showed that the *de novo* synthesis of anti-HLA antibodies after kidney transplantation was associated with poor allograft outcome [3]. This detrimental immune response to the allograft was caused mainly by anti-HLA class I antibodies and mediated by T lymphocytes [4]. However, the role of anti-HLA antibodies in the development of vascular defects, which may result in the rejection of the kidney allograft, it is still not completely elucidated. Preexisting antibodies can disappear from the circulation after kidney transplantation, with immunoglobulin being deposited in vascular, glomerular, and tubulointestinal areas of the graft. Furthermore, antibodies reappear or the antibody titer rises after removal of a graft, respectively [5,6]. But the impact of these antibodies on the development of rejection episodes varies between patients and is dependent on patient-specific clinical factors. However, preformed antibodies in the recipient bind to and finally destroy the endothelium of the transplanted kidney allograft, but there are functional differences regarding the relevance of anti-HLA class I and class II antibodies. Recent data demonstrate a relevance of donor-specific anti-HLA class II antibodies, especially in the field of chronic rejections, whereas anti-HLA class I antibodies are mainly involved in acute rejection episodes [7].

Screening for such alloreactive antibodies was traditionally performed using the complement-dependent cytotoxicity assay (CDC), which detects complement-binding immunoglobulin (Ig) G1/3 and IgM antibodies [8]. The CDC comprises a panel of HLA typed lymphocytes and enables the determination of panel reactive antibodies (% PRA). However, the specificity of the CDC is limited due to positive reactions mediated through non-HLA-specific cytotoxic antibodies. In addition, the sensitivity of the CDC is also limited because only complement-activating antibodies result in positive reactions. More recent solid phase methods, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and flow cytometry-based techniques, were introduced to overcome the limited sensitivity and specificity of the CDC assay [9,10]. An additional advantage of these new techniques is a differential detection of anti-HLA class I and class II IgG antibodies, which are generally accepted to be of relevance for kidney transplantation. These solid phase assays use a secondary antibody that detects primary HLA-specific IgG antibodies of all subclasses (IgGall). Therefore, these antibody detection systems are not able to differentiate complement-binding IgG1 and IgG3 antibody isotypes from non-complement-binding IgG2 and IgG4 isotypes. Although

the role of different IgG subclasses of alloantibodies for the allograft survival after kidney transplantation is still controversial, it has been suggested that non-complement-binding IgG2, IgG4, and IgA alloantibodies contribute to the development of rejections [11]. In contrast, for non-complement-binding anti-HLA antibodies of the IgA isotype even a beneficial effect for the allograft was discussed [12].

However, several reports suggest that non-HLA-specific antibodies seem to play a role in the development of rejection episodes after kidney transplantation: non-HLA specific antibodies eluted from rejected kidneys bind to and activate human endothelial cells using an *in vitro* assay [13], demonstrating an additional effect of non-HLA-specific antibodies to allograft rejection. This is supported by clinical trials with large patient cohorts analyzing the graft outcome in HLA identical kidney transplantations, e.g., most recently by the CTS group [14]. They suggest that non-HLA immunity has a much stronger role in clinical transplantation than previously thought, especially in the context of chronic graft rejection. Moreover, recent reports show that MICA allotypes may also play a role in rejection episodes because of their endothelial cell-specific expression and their capacity to induce antibodies with complement-dependent cytotoxicity [15]. In support of this hypothesis, we could demonstrate that MICA-specific antibodies can be detected in eluates from irreversibly rejected and explanted kidney allografts [16].

In general, studies analyzing antibodies eluted from rejected and explanted renal allografts or from biopsy material are rare in the literature and were mainly published several years ago, as was done by our group, illustrating the presence of lymphocytotoxic antibodies in eluates in a study analyzing 81 nonfunctioning and explanted kidney allografts [17]. However, some recent reports demonstrate HLA specificities of antibodies eluted from rejected kidneys or obtained from needle biopsies [18,19].

The aim of our study was to investigate the impact of a humoral immune response against the allograft and especially the role of anti-HLA antibodies of different immunoglobulin isotypes. Therefore, we isolated antibodies accumulated in explanted kidneys and performed HLA antibody screening using CDC together with commercially available and modified ELISA and Luminex assays to distinguish different immunoglobulin isotypes of the antibodies.

Materials and methods

Patients

Ninety-four explanted kidney allografts from 93 recipients (54 male and 39 female), transplanted between 1982 and 1998, were analyzed. No samples from our previously reported study [17] were used. One patient contributed two different kidney allografts to this work. The patient demographics are shown in Table 1. HLA typing of donors and recipients was performed by HLA-A, -B serology. HLA class II typing was done by HLA-DR, -DQ serology or two-digit resolution polymerase chain reaction-single-strand polymorphism for HLA-DRB1 and -DQB1, respectively. Seventy-five kidneys were first transplantations, 16 were second transplantations, and 3 additional allografts were third transplantations. All patients received a kidney from a deceased donor. The mean HLA mismatch rate between

Table 1 Patient demographics.

Parameter	Total	Group with failures due to rejections ^b	Group with failures due to other reasons ^b
Number of transplantations ^a	94	52	36
Patient gender			
Male	54	27	21
Female	39	25	15
Patient age (years, mean \pm SD)	41.50 \pm 13.95	40.46 \pm 13.37	41.89 \pm 14.89
Donor age (years, mean \pm SD)	43.93 \pm 17.34	44.02 \pm 16.22	43.81 \pm 19.09
HLA-Mismatch			
HLA-A, B (mean \pm SD)	1.67 \pm 1.08	1.75 \pm 1.15	1.57 \pm 0.98
HLA-DR (mean \pm SD)	0.53 \pm 0.61	0.61 \pm 0.64	0.43 \pm 0.57
First transplantation	75	42	27
Re-transplantation	19	10	9
PRA < 5% pretransplantation	65	34	25
PRA > 5% pretransplantation	29	18	11
Allograft survival (days, mean/SEM) ^b	690.0/112.8	582.5/123.3 ^c	846.4/210.0 ^c

^a The total number of 94 kidney eluates was obtained from 94 transplantations in 93 patients.

^b Clinical follow up data was available from 88 patients. The kidney allografts lost due to rejections and the allografts lost due to other reasons are shown in comparison to the whole study group.

^c $p = \text{NS}$.

patients and donors was 1.67 (HLA-A, -B) and 0.53 (HLA-DR). In our patient cohort 29 patients (31%) had PRA > 5% before transplantation (minimum 5% PRA, maximum 95% PRA). All patients received cyclosporine-based immunosuppression, usually in combination with azathioprine and prednisone, when available for later transplantations. Antithymocyte globulin was given to treat rejections. The loss of graft function was generally histologically diagnosed in all patients concerned.

Clinical follow up data were available from 88 of 93 patients. In 52 (59%) of the patients the loss of kidney allograft function was recorded as being due to rejection. The remaining 36 patients (41%) lost their grafts because of chronic allograft nephropathy ($n = 8$), allograft venous thrombosis that did not clearly result from rejection episodes ($n = 7$), recurrent primary disease ($n = 6$), technical problems ($n = 5$), infection of the allograft ($n = 3$), and other reasons ($n = 7$). Rejections were confirmed by renal biopsies in all 52 patients. The biopsies revealed only humoral rejections in 5 patients; 6 additional patients had humoral and cellular rejection episodes. Only cellular rejections were diagnosed in 47 patients, of whom 8 had cellular vascular and 20 had cellular interstitial rejections. In 19 patients the cellular rejection type could not be determined. The mean time of graft function of all 88 transplantations with follow up data was 690 days (112.8 SEM), whereas the mean time of graft function in the patients with graft loss because of rejection was 583 days (123.3 SEM) compared with 846 days (210.0 SEM) in the group of graft losses due to other reasons. However, this difference was not significant ($p = 0.86$).

Elution procedure

Parts of the explanted kidneys were stored at -20°C . We isolated accumulated antibodies by acid elution as previously described [17]. In brief, fragments of explanted cadaveric kidney allografts were thawed, minced, and washed in phosphate-buffered saline. Proteins were eluted by glycine-HCl, neutralized, and extensively dialyzed against phosphate-buffered saline. Finally, the immunoglobulins were concentrated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and the resuspended precipitates were again dialyzed.

HLA antibody screening procedure

Initially, serum samples collected before and after transplantation from all patients were analyzed for the presence of lymphocytotoxic antibodies by CDC. After the kidney eluates were prepared, the specificity of eluted antibodies was first characterized by CDC with the addition of dithiothreitol to exclude positive reactions resulting from the presence of IgM antibodies, using a locally prepared panel of HLA typed lymphocytes. Additionally, all eluates were analyzed using commercially available ELISA (LAT, One Lambda, Inc., Los Angeles, CA, USA) and flow cytometry technology based on Luminex (LABScreen, One Lambda, Inc.). The LAT and LABScreen tests were performed according to the manufacturers' instructions. Briefly, purified HLA antigens were immobilized directly onto microtiter trays (ELISA) or on a panel of microbeads (Luminex) and used as a target for anti-HLA antibodies in a given sample instead of viable cells as targets for the antibodies when the CDC is used. Anti-HLA antibodies of the IgG isotypes, which are bound to the microbeads, were detected by a secondary IgG-specific phycoerythrin-conjugated antibody, whereas the commercially available LAT uses an alkaline phosphatase-conjugated IgG-specific secondary antibody. The high-throughput Luminex methodology enables detection of both specific microbead and secondary Phycoerythrin-conjugated antibody, together in a precision fluid stream using two different detection lasers.

In the second part of this study the IgG-specific secondary antibodies used in the commercially available ELISA and Luminex systems were replaced by antibodies specific for IgG2, IgG4, IgA1, and IgA2 isotypes to determine the non-complement-binding isotypes of the eluted anti-HLA antibodies. All isotype-specific antibodies were obtained from Southern Biotech (Birmingham, AL, USA). Alkaline phosphatase-conjugated antibodies were used for ELISA, whereas phycoerythrin-labeled antibodies were used for HLA antibody specification using Luminex. The modification of the ELISA was validated as described earlier using chimeric mouse/anti-human antibodies (chF3.3-X) directed against HLA class II and differing only in their heavy chains [20,21]. The validation of the Luminex assay was performed in accordance with the ELISA validation procedure. The HLA specificities detected were evaluated on the

Table 2 Characterization of anti-HLA antibodies in 94 explanted kidneys using CDC, commercial ELISA and Luminex™ techniques.

Assay	CDC	ELISA (LAT™)	Luminex™ (LABScreen™)	ELISA (LAT™)	Luminex™ (LABScreen™)
HLA	Class I	Class I	Class I	Class II	Class II
Positive	27 (29%)	48 (51%)	60 (64%)	34 (36%)	40 (43%)
Negative	67 (71%)	46 (49%)	34 (36%)	60 (64%)	54 (57%)
		$r = 0.39$ $p = 0.0002^a$		$r = 0.47$ $p < 0.0001^b$	
With donor HLA specificity	10/27 (37%)	14/48 (30%)	20/60 (33%)	9/34 (26%)	6/40 (15%)

^a Correlation coefficient ELISA class I vs. Luminex™ class I.^b Correlation coefficient ELISA class II vs. Luminex™ class II.

broad antigen level and were compared with the HLA mismatches of the transplanted and later explanted kidney.

For a general HLA antibody screening of the eluates (presence or absence of anti-HLA antibodies) and also for the identification of anti-HLA antibodies with donor specificities all methods described were used (CDC, ELISA, and Luminex).

Statistics

The antibody screening results were correlated with graft survival (in days). Data were expressed as means and SEM or SD. The correlation between isolated parameters was estimated by Spearman's correlation coefficient. The Mann-Whitney *U* test was used to compare two groups. $p < 0.05$ was considered significant. All analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Lymphocytotoxic antibodies were present in 27 of 94 eluates (29%) using the CDC assay (Table 2). In 37% these antibodies were donor specific. Anti-HLA class I antibodies were found by commercial ELISA and Luminex assays in 48/94 (51%) versus 60/94 (64%) eluates ($r = 0.39$, $p = 0.0002$), compared with 36% versus 43% for anti-HLA class II positive eluates ($r = 0.47$, $p < 0.0001$), demonstrating the higher sensitivity of these assays compared with the CDC results. Both solid phase methods detected donor-specific anti-HLA class I antibodies with similar frequencies (30% vs. 33%), but the number of eluates with donor-specific anti-HLA class II antibodies increased when analyzed with ELISA in comparison with Luminex methodology (26% vs. 15%, Table 2). In only 1 patient did we assume cytotoxic antibodies against non-HLA as 100% of the cell panel reacted with this eluate in CDC even after dithiothreitol treatment, but no reaction was observed in ELISA and Luminex assays.

In total, we found 58 IgGall-positive eluates using ELISA: 24 were anti-HLA class I positive, 10 were positive for anti-HLA class II, and 24 were anti-HLA class I and II positive (as shown in Table 3). Next we analyzed all 58 IgGall-positive eluates with the modified ELISA methodology to evaluate the distribution of non-complement-binding IgG2/4 antibodies. The IgA1/2 antibodies were analyzed in all 94 eluates. A total of 16/58 eluates (28%) were positive for IgG2 and IgG4 antibodies: 15 anti-HLA class I and 5 anti-HLA class II specific. IgA1/2 antibodies could be detected in 9 eluates (10%

of all 94 eluates analyzed) when the modified generic ELISA was used (Table 3). Five of these eluates had anti-HLA class I and another 5 had anti-HLA class II antibodies. Using the modified Luminex technique we found donor-specific anti-HLA class I IgG2/4 antibodies in 7 eluates (54% of the IgG2/4-positive eluates), whereas 2 eluates had donor-specific anti-HLA class II IgG2/4 antibodies (50%). However, anti-HLA IgA1/2 antibodies could only be determined in 2 patients (1 with HLA-DR1 donor specificity) using Luminex (Table 4). Our results indicate a higher specificity of the Luminex assay compared with the modified ELISA technique: 1 eluate with an ELISA-positive IgG2/4 antibody status was negative after Luminex analysis, and 7/9 ELISA IgA-positive eluates turned negative using Luminex.

As described above, we included 29 patients with PRA in the patient's serum prior to transplantation (>5% PRA) in our study. In 14 of these patients' sera we could determine HLA specificities of cytotoxic antibodies prior to transplantation using the CDC assay. After transplantation we found the same HLA specificities in 10/14 patient sera. The remaining 4 sera had a negative PRA after transplantation. Interestingly, in 7 kidney eluates we could confirm the historic serum HLA specificities pre- and posttransplantation that were not directed against the mismatched HLA antigens of the ectomized kidney allograft. Moreover, the historic antibody specificities found in the sera did not belong to the same cross-reactive groups of the mismatched HLA antigens on the transplanted kidneys, suggesting a general accumu-

Table 3 Non-complement binding IgG2/4 and IgA1/2 anti-HLA antibodies in explanted kidneys, determined by immunoglobulin isotype specific ELISA.

	Number of eluates		
	IgGall (LAT™)	IgG2/4 (mod. ELISA)	IgA1/2 (mod. ELISA)
HLA class I positive	24	12	4
HLA class II positive	10	1	4
HLA class I + II positive	24	3	1
Negative	36	42	85
Total	94	58	94

lation of antibodies in the renal allograft without restriction to donor specificity.

The mean graft survival in patients with graft loss due to rejection was lower than in patients who lost allograft function due to nonimmunological reasons (583 days, SEM 123.3, minimum 0, maximum 3.462 days vs. 846 days, SEM 210.0, minimum 0, maximum 4.090 days). To evaluate the impact of anti-HLA antibodies detected in the eluates on kidney allograft survival we analyzed the subgroup of 52 irreversibly rejected kidneys and correlated the HLA antibody status of these eluates with graft survival (Figure 1A). Our results indicate that only the presence of donor-specific anti-HLA class II antibodies in the eluates detected by the sensitive Luminex assay (31 positive vs. 21 negative eluates) seemed to be associated with shorter graft function ($p = ns$). All additional comparisons revealed no differences in graft survival or even a prolonged graft survival when anti-HLA class I antibodies (with or without donor specificity) were present (Figure 1B).

The presence of anti-HLA IgG antibodies in the subgroup of eluates generated from clearly immunologically rejected kidney allografts was generally associated with prolonged graft survival compared with the negative eluates (Figure 2). Regarding IgGall-positive and IgG2/4-positive eluates, there was no difference in graft survival between these groups. The same relations could be observed when donor-specific anti-HLA antibodies of the IgGall and also the IgG2/4 isotypes were analyzed (Figure 2). However, graft survival of two kidneys that had accumulated anti-HLA antibodies of the IgA isotype was very short (0 and 1 day): One kidney accumulated additional complement binding antibodies, but the other kidney eluate was completely negative for cytotoxic and also IgGall antibodies.

To further analyze our observation of an increased graft survival of anti-HLA antibody-positive kidneys we checked the frequencies when the rejections occurred in the patients. In the whole study group 18 patients had no signs of rejection after transplantation. However, 42 patients developed single rejection episodes and 11 patients developed two or more rejection episodes after transplantation. In 36 patients the rejections were cause for allograft loss, as already described. However, the association between graft survival and anti-HLA antibody status in the eluates did not

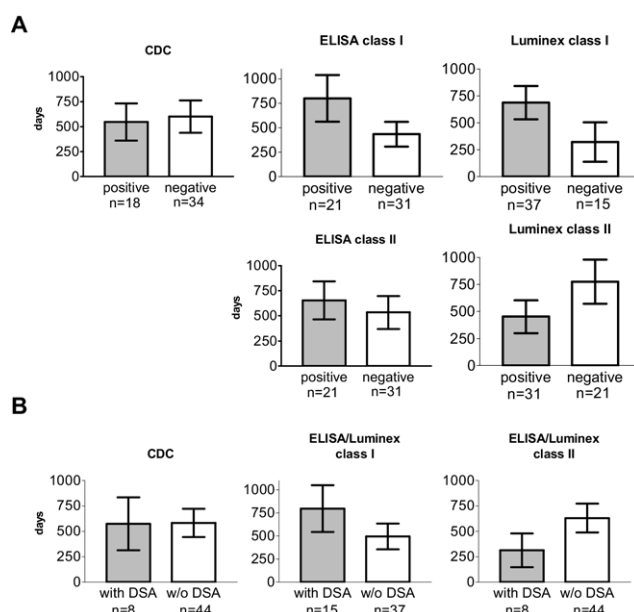


Figure 1. Anti-HLA antibody status and kidney allograft survival in 52 patients with graft loss due to rejections. (A) Allograft survival and anti-HLA antibody status determined using different methods is shown (days = mean + SEM); (B) donor-specific anti-HLA antibody status determined by CDC and solid phase assays is shown (days = mean + SEM).

differ from previously observed findings. Interestingly, 7 additional patients developed refractory rejections: Five of them were immunized prior to transplantation, and another 5 developed both lymphocytotoxic and non-complement-activating antibodies after transplantation, but regarding the graft survival there was again no difference from previous results.

Finally, we performed a survival analysis in the group of patients with loss of allograft function that was not immunologically mediated. Again, we demonstrated increased graft survival when anti-HLA antibodies of different immunoglobulin isotypes were present in the kidney eluates (Figure 3).

Table 4 HLA specification of IgG2/4 and IgA1/2 antibodies using an immunoglobulin isotype specific Luminex™ technique.

HLA	Number of eluates			
	IgG2/4		IgA1/2	
	Class I	Class II	Class I	Class II
With HLA specificity	13	4	2	2
With donor HLA specificity	7	2	0	1
ELISA positive but Luminex™ negative	1	0	7	7
Total	14	4	9	9

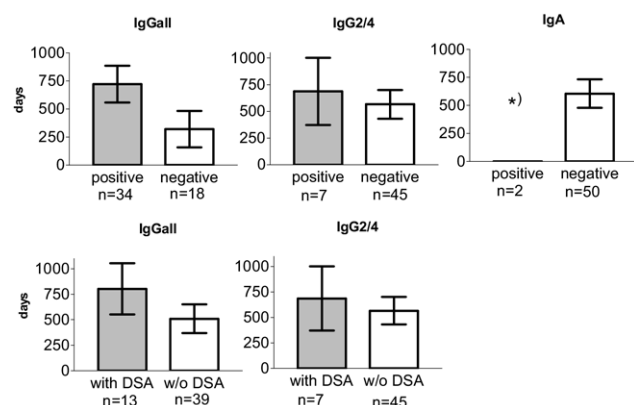


Figure 2. Kidney allograft survival and non-complement-binding anti-HLA antibodies in 52 patients with graft loss due to rejections. Allograft survival and complement-binding and non-binding anti-HLA antibody status is shown (days = mean + SEM). *Graft survival of the corresponding kidneys was 0 and 1 day, respectively ($p = ns$).

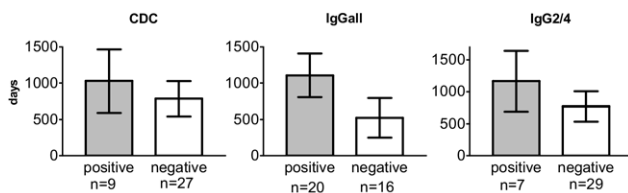


Figure 3. Kidney allograft survival anti-HLA antibodies in 36 patients with graft loss due nonimmunological reasons. Allograft survival and anti-HLA antibody status is shown (days = mean + SEM); The patients lost their grafts due to chronic allograft nephropathy ($n = 8$), allograft venous thrombosis ($n = 7$), recurrent primary disease ($n = 6$), technical problems ($n = 5$), infection of the allograft ($n = 3$), or other reasons ($n = 7$).

Discussion

Transplantation of donated kidney allografts is an important and broadly accepted treatment for end-stage renal failure. However, detrimental immune responses to the allograft are still a major problem and reduce successful transplant outcome. In this context the role of anti-HLA antibodies still remains not fully understood. The introduction of ELISA and flow cytometry-based techniques for the detection and definition of anti-HLA antibodies has improved the HLA antibody screening procedure pre- and post-transplantation, but the clinical relevance of additional HLA specificities detected by these sensitive assays in comparison with the traditional CDC assay remains unclear. Moreover, it should be emphasized that antibody screening assays are normally performed using patient serum, i.e., peripheral blood. The venous antibody status of a patient after kidney transplantation may not reflect the situation directly in the kidney allograft. To address this issue we focused on antibodies accumulating in the kidney allografts. We isolated antibodies accumulated in explanted kidneys using acid elution and performed HLA antibody screening using CDC together with commercially available ELISA and Luminex assays. Moreover, we modified the commercially available assays and extended them to differentiate HLA antibody isotypes in the eluates.

The presence of donor-specific anti-HLA antibodies in the kidney eluates was clearly shown. The analysis of the eluates by unmodified ELISA and Luminex methods revealed a higher prevalence of anti-HLA class I and II antibodies within the eluates, demonstrating the higher sensitivity of these assays compared with the CDC results. In one patient we also could detect cytotoxic non-HLA antibodies. Our study demonstrated anti-HLA antibodies in approximately 50% of the eluates. This group of positive eluates was not consistent with the group of clearly rejected kidney allografts, which was also approximately half of the total study group. A first explanation for this obvious discrepancy could be the impact of, e.g., T-lymphocyte-mediated cellular rejection episodes on allograft survival, which are not antibody mediated. Second, there were antibodies initially present in the kidney allograft during rejection episodes but the allograft remained functioning. When the allograft was explanted, these initial antibodies might be absent. Third, the protein elution procedure itself was insufficient. We also observed

variations in the sample quality resulting from storage duration of the explanted kidneys in our study.

The central finding of our study is a prolonged graft survival when anti-HLA antibodies (with or without donor specificity) were present in the eluates generated from irreversibly rejected kidneys compared to the eluates without anti-HLA antibodies. Especially, the relevance of anti-HLA class I antibodies detected by the sensitive Luminex method in our study remains questionable. We could not describe a decrease in kidney allograft survival when HLA class I specific antibodies with or without donor specificities were present in the eluates, as one would have expected. Only for the presence of lymphocytotoxic and also donor-specific anti-HLA class II antibodies could a trend to a reduced graft survival be observed.

A prolonged graft survival could also be demonstrated when non-complement-activating IgG2/4 antibodies were present. This finding is contradictory to several reports suggesting that non-complement-activating IgG2/4 antibodies may contribute to early graft failure [11,23,24]. Complement-activating IgM is the first immunoglobulin subclass secreted by naive B lymphocytes in response to antigen stimulation, followed by IgG1 and IgG3 and later by the non-complement-binding IgG2 and IgG4 subclasses [25]. The presence of IgG2 and IgG4 antibodies in kidney eluates confirms this serial IgG subclass switching mechanism also for anti-HLA antibodies. However, the presence of non-complement-activating antibodies can be the result of an immunoglobulin class switch from previously induced complement-activating IgG1 and IgG3 to the IgG2 and IgG4 class at the moment of transplantation. Alternatively, non-complement-activating antibodies can be a bystander product in the course of transplant rejection. Therefore, longitudinal studies based on the modified ELISA methodology are required to elucidate the role of non-complement-activating anti-HLA antibodies in allograft rejection and to define their first occurrence after transplantation. Another interesting finding of our study was the presence of anti-HLA antibodies in rejected kidneys that were not directed against donor HLA antigens but have already been proved in the patient serum prior to the transplantation. This unspecific antibody binding may also be a side effect of an active immune system of a patient after transplantation, resulting in inflammatory activity, which finally leads to allograft loss. Moreover, our results indicate that such an immunological environment may lead to rejections refractory to immunosuppressive treatment.

Regarding the relevance of IgA antibodies for the outcome of kidney transplantations, a large multicenter study has demonstrated that kidney transplant recipients with a high pretransplant serum IgA-anti-Fab autoantibody activity seem to have a high graft survival rate [26]. Moreover, kidney transplant patients suffering from IgA nephropathy may have a reduced risk of rejection because IgA anti HLA antibodies may neutralize the effects of anti-HLA antibodies of the IgG isotype [27]. However, recent studies could not confirm a generally better outcome after kidney transplantation in IgA nephropathy patients [28,29]. Our results could not show a beneficial effect of anti-HLA antibodies of the IgA isotype for the graft survival as well, but IgA-positive eluates were generally rare in our study. Moreover, only 1 of the 93 patients included in the study suffered from IgA nephropathy

as primary kidney disease and the corresponding kidney eluate had no IgA antibodies.

In conclusion, we could clearly show that explanted kidney allografts harbor non-complement-binding HLA-specific antibodies when sensitive antibody detection techniques like ELISA and Luminex are used. Moreover, our results indicate that non-complement-binding HLA-specific antibodies do not contribute to allograft rejections leading to early graft loss, but further efforts are needed to finally define the role of non-complement-activating antibodies for renal transplantation outcome. Our results are in concordance with the pathophysiological mechanisms of hyperacute and acute rejection episodes, which require the presence of complement-activating antibodies. However, non-complement-activating antibodies may be of relevance for the allograft function when modulating rejection processes. These antibodies are detectable with ELISA and Luminex in the peripheral blood even when directed against and consequently bound to donor-specific antigens on the allograft. Therefore, an antibody screening of patient sera posttransplantation using sensitive detection techniques is recommended if a decrease of kidney allograft function is recorded (e.g., increasing serum creatinine) for early diagnosis of anti-HLA antibody-mediated rejection episodes.

References

- [1] Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 2:662, 1966.
- [2] Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 280:735, 1969.
- [3] Martin S, Dyer PA, Mallick NP, Gokal R, Harris R, Johnson RW. Post-transplant antidonor lymphocytotoxic antibody production in relation to graft outcome. *Transplantation* 44:50, 1987.
- [4] Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 53:550, 1992.
- [5] Garovoy MR, Gailiunas P, Carpenter CB, Busch GJ. Immunologic monitoring of transplant rejection: correlation of in vitro assays with morphologic changes on transplant biopsy. *Nephron* 22:208, 1978.
- [6] Andres GA, Accinni L, Hsu KC, Penn I, Porter KA, Rendall JM, Seegal BC, Starzl TE. Human renal transplants. 3. Immunopathologic studies. *Lab Invest* 22:588, 1970.
- [7] Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 75:1034, 2003.
- [8] Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204:998, 1964.
- [9] Zachary AA, Ratner LE, Graziani JA, Lucas DP, Delaney NL, Leffell MS. Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: II. Clinical relevance. *Hum Immunol* 62:236, 2001.
- [10] Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 75:43, 2003.
- [11] Karuppan SS, Ohlman S, Moller E. The occurrence of cytotoxic and non-complement-fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection episodes. *Transplantation* 54:839, 1992.
- [12] Koka P, Chia D, Terasaki PI, Chan H, Chia J, Ozawa M. The role of IgA anti-HLA class I antibodies in kidney transplant survival. *Transplantation* 56:207, 1993.
- [13] Lucchiari N, Panajotopoulos N, Xu C, Rodrigues H, Ianhez LE, Kalil J, Glotz D. Antibodies eluted from acutely rejected renal allografts bind to and activate human endothelial cells. *Hum Immunol* 61:518, 2000.
- [14] Opelz G. Collaborative Transplant Study. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* 365:1570, 2005.
- [15] Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, Esquenazi V, Miller J, Shih RN, Pei R, Ozawa M, Lee J. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant* 9:2265, 2005.
- [16] Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, Sireci G, Wang Z, Lavignia B, Stastny P. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol* 67:230, 2006.
- [17] Vögeler U, Doxiadis I, Buchholz B, Eigler FW, Lison W, Niebel W, Zastrow F, Grosse-Wilde H. Cytotoxicity of antibodies eluted from rejected kidney allografts. *Transpl Proc* 17:2630, 1985.
- [18] Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justrabo E, Rife G. Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 76:395, 2003.
- [19] Martin L, Guignier F, Bocrie O, D'Athis P, Rageot D, Rife G, Justrabo E, Mousson C. Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 79:1459, 2005.
- [20] Arnold ML, Zacher T, Dechant M, Kalden JR, Doxiadis II, Spriewald BM. Detection and specification of noncomplement binding anti-HLA alloantibodies. *Hum Immunol* 65:1288, 2004.
- [21] Dechant M, Vidarsson G, Stockmeyer B, Repp R, Glennie MJ, Gramatzki M, van De Winkel JG, Valerius T. Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing. *Blood* 100:4574, 2002.
- [22] Feucht HE, Opelz G. The humoral immune response towards HLA class II determinants in renal transplantation. *Kidney Int* 50:1464, 1996.
- [23] Cecka JM, Terasaki PI. Repeating HLA antigen mismatches in renal retransplants—a second class mistake? *Transplantation* 57:515, 1994.
- [24] Fuller A, Profaizer T, Roberts L, Fuller TC. Repeat donor HLA-DR mismatches in renal transplantation is the increased failure rate caused by noncytotoxic HLA-DR alloantibodies? *Transplantation* 68:589, 1999.
- [25] Malisan F, Briere F, Bridon JM, Harindranath N, Mills FC, Max EE, Banchereau J, Martinez-Valdez H. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med* 183:937, 1996.
- [26] Susal C, Dohler B, Opelz G. Graft-protective role of high pre-transplantation IgA-anti-Fab autoantibodies: confirmatory evidence obtained in more than 4000 kidney transplants. The Collaborative Transplant Study. *Transplantation* 69:1337, 2000.
- [27] Lim EC, Chia D, Gjertson DW, Koka P, Terasaki PI. In vitro studies to explain high renal allograft survival in IgA nephropathy patients. *Transplantation* 55:996, 1993.
- [28] Andresdottir MB, Haasnoot GW, Doxiadis II, Persijn GG, Claas FH. Exclusive characteristics of graft survival and risk factors in recipients with Immunoglobulin A nephropathy: a retrospective analysis of registry data. *Transplantation* 80:1012, 2005.
- [29] Ponticelli C, Traversi L, Feliciani A, Cesana BM, Banfi G, Tarantino A. Kidney transplantation in patients with IgA mesangial glomerulonephritis. *Kidney Int* 60:1948, 2001.